



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Oncologia e Oncologia Chirurgica

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA
XXI CICLO**

TESI DI DOTTORATO

HPV E CARCINOMA DELLA CERVICЕ UTERINA

Coordinatore: Ch.ma Prof.ssa Paola Zanovello

Supervisore: Ch.ma Dott.ssa Annarosa Del Mistro

Dottoranda: Helena Frayle Salamanca

INDICE

RIASSUNTO

CARATTERISTICHE GENERALI	p. 1
1. Struttura genomica dell'HPV	p. 2
1.1. Proteine virali	p. 3
1.2. Ciclo virale	p. 9
1.2.1. Mantenimento del genoma	p. 10
1.2.2. Fase proliferativa	p. 10
1.2.3. Amplificazione genica	p. 11
1.2.4. Assemblaggio delle particelle virali	p. 11
1.3. Meccanismi patogenetici	p. 12
1.4. Classificazione dei Papillomavirus	p. 13
1.5. Vie di trasmissione	p. 15
1.5.1. Orizzontale	p. 15
1.5.2. Verticale	p. 15
1.6. Storia naturale	p. 16
1.7. Cofattori	p. 17
1.7.1. Fattori che appartengono all'ospite	p. 17
1.7.2. Fattori virali	p. 18
1.8. Aspetti clinici delle infezioni da HPV	p. 19
1.8.1. Manifestazioni cliniche	p. 19
1.8.2. Epidemiologia	p. 22
1.9. Metodologie diagnostiche delle infezioni da HPV	p. 24
1.9.1. Citologia	p. 24
1.9.2. Colposcopia	p. 27
1.9.3. Istologia	p. 27
1.9.4. Immunoistochimica	p. 29
1.9.5. Test molecolare	p. 30

1.10. Immunità e HPV	p. 33
1.11. Terapie	p. 35
SCOPO DELLO STUDIO	p. 39
2.1. Disegno e obiettivi dello studio ASC-US	p. 40
2.2. Disegno e obiettivi dello studio NTCC	p. 41
MATERIALI E METODI	p. 43
3.1. Popolazione e campioni	p. 43
3.2. Hybrid Capture 2 HPV DNA Test	p. 44
3.3. Estrazione del DNA	p. 45
3.4. Amplificazione del DNA mediante PCR	p. 46
3.5. Analisi dei prodotti amplificati per la tipizzazione	p. 48
3.6. Valutazione dell'espressione di mRNA E6/E7	p. 50
3.7. Analisi e statistica	p. 52
RISULTATI	p. 53
4.1. Tipizzazione carcinomi cervicali	p. 53
4.2. Studio ASC-US	p. 55
4.2.1. Esiti del Test all'arruolamento	p. 55
4.2.1.1. Test HC2	p. 55
4.2.1.2. Risultati del Pap test	p. 56
4.2.1.3. Risultati della colposcopia	p. 56
4.2.2. Tipizzazione campioni positivi al test HPV (HC2)	p. 57
4.2.3. Risultati del Follow-up	p. 63
4.2.4. HPV Proofer	p. 66
4.3. Studio NTCC	p. 66
4.3.1. Risultati test HC2 all'arruolamento	p. 67
4.3.2. Tipizzazione campioni positivi al test HPV (HC2)	p. 68
4.3.3. Analisi del rapporto RLU/PC del test HC2	p. 72
4.4. Confronto fra le metodiche di tipizzazione	p. 73

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

p. 77

BIBLIOGRAFIA

RIASSUNTO

L'identificazione del Papillomavirus Umano (HPV) come causa necessaria per lo sviluppo del carcinoma della cervice uterina e la rilevazione dei diversi tipi di HPV con diverso potenziale oncogeno mediante tecniche molecolari hanno reso possibile lo studio di nuove strategie nello screening (trriage, test primario) basate su test molecolari che possono permettere di individuare con maggiore accuratezza le donne a rischio di sviluppare una lesione di alto grado o un carcinoma invasivo. Con questa informazione abbiamo effettuato la ricerca e la tipizzazione di sequenze HPV in diverse casistiche: come triage delle donne con diagnosi di ASC-US in uno studio multicentrico che ha coinvolto i servizi di screening di cinque ULSS del Veneto per valutare sensibilità e specificità del test HPV rispetto alla ripetizione del Pap test o alla colposcopia. L'utilizzo del test HPV nello screening come test primario è invece l'oggetto dello studio Nuove Tecnologie per lo screening del Carcinoma Cervicale (NTCC). Si tratta di un trial multicentrico randomizzato su 95.000 donne, in 9 centri di screening in Italia, il cui principale obiettivo è valutare se, rispetto al Pap test tradizionale, il test per la ricerca dei tipi ad alto rischio dell'HPV (HC2, Digene) permette di migliorare l'efficacia dello screening. Vengono qui presentati i dati di tipizzazione dei campioni HC2 positive delle donne arruolate a Padova. È stato condotto anche uno studio di valutazione della prevalenza tipo-specifica in carcinomi invasivi della cervice uterina.

I risultati mostrano che il test HC2 nello studio ASC-US è più sensibile e più specifico rispetto alla colposcopia e alla ripetizione del Pap test.

Nello studio NTCC il test HC2 ha mostrato una sensibilità più alta del Pap test ma una minore specificità; si è visto che aumentando il valore soglia da 1 a 2pg/ml migliora la specificità mantenendo una buona sensibilità.

In entrambi gli studi le donne con un risultato negativo al test HC2 hanno mostrato un rischio molto basso di sviluppare lesioni di alto grado.

Per quanto riguarda la tipizzazione i risultati indicano, in tutte le casistiche, l'HPV 16 come tipo più frequente e una sua elevata associazione con lesioni di alto grado e carcinomi.

Analizzando le varianti virali dei campioni HPV 16 è emerso che la maggioranza delle lesioni di alto grado e i carcinomi cervicali sono associati alla variante virale europea T350G (L83V).

Gli aspetti tecnici da considerare per la ricerca e la tipizzazione dell'HPV sono tipo e metodo di prelievo e conservazione del campione, set dei primers utilizzati, metodo di tipizzazione. Le diverse strategie da noi impiegate hanno mostrato caratteristiche peculiari di sensibilità e specificità nell'identificare i tipi di HPV, e va sottolineato che l'utilizzo di una strategia con più di una metodica ha permesso, in entrambi gli studi, di tipizzare più del 90% dei campioni. Tutti i metodi di tipizzazione hanno mostrato un'elevata affidabilità nella rilevazione di HPV 16 e HPV 18.

SUMMARY

The identification of Human Papillomavirus (HPV) as a necessary cause for the development of cervical cancer and the detection of the different HPV oncogenic types through molecular techniques has made it possible the study of new strategies for the screening (triage, primary test) that can permit to identify with greater accuracy women at risk to develop a high-grade lesion or an invasive carcinoma. Given this information, we have performed search and typing of HPV sequences for triage of women with ASC-US diagnosis in a multicentric study that has involved five screening centres of the Veneto region to evaluate sensitivity and specificity of HPV test in comparison to the Pap test repetition or colposcopy . The use of HPV test as a primary screening test is the object of the NTCC (New Technologies for Cervical Cancer) randomized trial. It has been conducted on 95.000 women enrolled from 9 cervical screening programmes in Italy; the study has the goal to evaluate the efficacy of HPV test, in comparison to conventional Pap test, in detecting high risk lesions.

We also conducted a study of type-specific prevalence in invasive carcinomas of the uterine cervix.

The results show that the HC2 test is more sensitive and more specific than colposcopy and or Pap test for the triage of women with an ASC-US diagnosis.

In the NTCC study the HC2 test showed greater sensitivity compared to Pap test but lower specificity; it has been observed that increasing the cut-off value from 1 to 2 pg/ml the test shows better specificity maintaining comparable sensitivity. In both studies women with a negative HC2 test have shown a very low risk to develop high grade lesions.

The typing results, in all the studies, pointed out HPV 16 as the most frequent type and its elevated association with high-grade lesions.

Analyzing HPV 16 variants, it has emerged that most of the high grade lesions and cervical carcinomas are caused by the European variant T350G (L83V).

The technical aspects to consider for HPV search and typing are: the method of specimen collection, set of primers and typing method. The different strategies used have shown peculiar characteristics of sensitivity and specificity on

identifying the different HPV types, and the use of a strategy with multiple methods has allowed, in both studies, to type more than 90% of the HC2+ specimens. All the typing methods have shown an elevated reliability in the detection of HPV 16 and HPV 18.

I PAPILOMAVIRUS

CARATTERISTICHE GENERALI

I papillomavirus (PV) appartengono alla famiglia dei Papillomaviridae [1]. Sono piccoli virus nudi a simmetria icosaedrica con DNA circolare a doppia elica di circa 8 kilobasi, contengono un capsidico icosaedrico di 55 nm di diametro sprovvisto di involucro, e possiedono uno specifico tropismo per gli epiteli, cutaneo e mucoso. La loro replicazione è ristretta a questo tipo di cellule ed è condizionata dallo stadio di differenziamento cellulare.

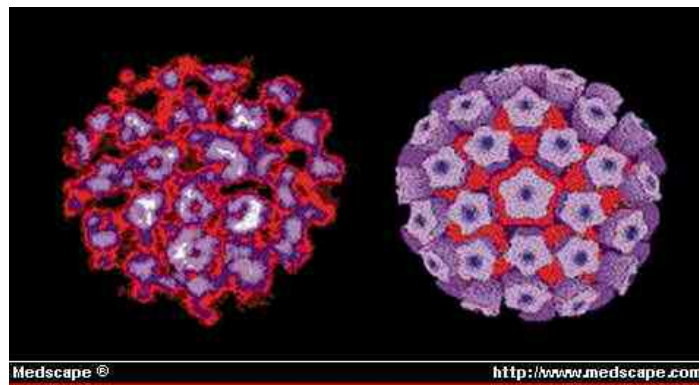


Figura 1. Ricostruzione computerizzata della struttura tridimensionale del Papillomavirus umano (da: <http://www.medscape.com>)

I PV sono stati rinvenuti in tantissime specie animali; e sono specie-specifici. Fino ad ora sono stati identificati circa 200 differenti tipi di papillomavirus umani (HPV); il genoma di 100 tipi di questi virus è stato completamente sequenziato e caratterizzato, circa 35-40 infettano l'area ano-genitale, alcuni di questi si associano quasi esclusivamente a lesioni benigne e vengono perciò detti tipi a basso rischio oncogeno, mentre altri si associano soprattutto a lesioni di alto grado e carcinoma invasivo e sono perciò detti tipi ad alto rischio oncogeno.

1. STRUTTURA GENOMICA DELL'HPV

Il genoma è essenzialmente diviso in tre regioni:

- La prima è una regione non codificante chiamata Long Control Region (LCR), le cui dimensioni sono notevolmente diverse tra i genomi dei diversi tipi di HPV (in media rappresenta il 5% del genoma virale, con un peso molecolare che varia da 400 a 1000 paia di basi). All'interno di questa regione sono concentrate le sequenze regolatorie richieste per la replicazione e trascrizione virale.
- La seconda è la regione Early (E) codificante per proteine virali precoci. Rappresenta il 45% del DNA virale e contiene sei geni espressi nella fase iniziale del ciclo replicativo, che codificano proteine non strutturali, denominate da E1 a E8, è implicata nella replicazione virale e nell'oncogenesi (produce proteine ad azione trasformante in grado di indurre proliferazione e immortalizzazione delle cellule umane).
- La terza è la regione Late (L) codificante per proteine virali tardive. Corrisponde al 40% del DNA, è una regione molto conservata che codifica per la sintesi delle proteine strutturali capsidiche, denominate L1-L2 (Figura 2) [2].

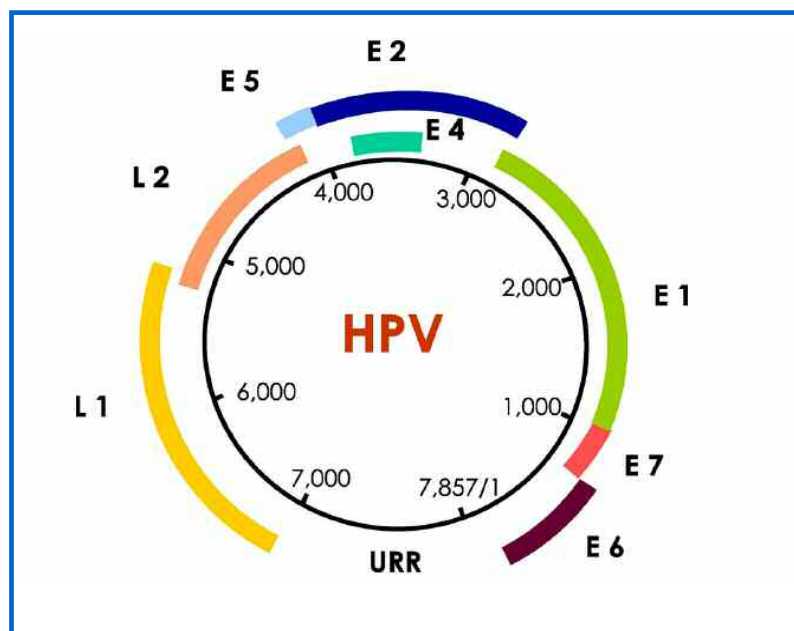


Figura 2. Organizzazione genomica del papillomavirus (Munoz 2006).

1.1. PROTEINE VIRALI

E1: È una proteina di 73 kDa essenziale per la replicazione virale; svolge un ruolo importante nella fase iniziale della replicazione del genoma virale, in collaborazione con E2. Presenta un'attività elicastica ATP-dipendente necessaria per il riconoscimento e l'inizio della sintesi del DNA.

E2: È una proteina dimerica di 40-45 kDa. Strutturalmente si distinguono: la porzione C-terminale che lega una sequenza palindromica di 12 paia di basi, una regione centrale e una terza regione N terminale. E2 è un importante regolatore della replicazione e della trascrizione virale; ed è attiva sotto forma di dimeri. Presenta diversi domini di legame al DNA; è inoltre presente una sequenza di legame a E1 [3]. E2 regola la trascrizione virale a livello di promotori precoci; a bassi livelli, E2 si lega a specifiche sequenze di riconoscimento e attiva i promotori precoci, mentre a concentrazioni elevate reprime la trascrizione bloccando il legame dei fattori di trascrizione. Il ruolo di E2 come repressore è molto importante nel regolare i livelli di E6 e E7, le due principali oncoproteine virali e la sua perdita rappresenta il primo stadio di trasformazione neoplastica.

E4: nonostante la sua inclusione tra le proteine precoci, è espressa tardivamente nel ciclo di replicazione virale ed è una delle proteine più abbondanti presenti durante il ciclo virale [4]. Il ruolo è legato all'infezione produttiva; sembra possa interagire con i filamenti intermedi di cheratina, rendendoli meccanicamente instabili e facilitando così il rilascio delle particelle virali.

E5: codifica per una proteina idrofobica, presente nelle membrane del compartimento di Golgi e anche nella membrana plasmatica. E5 svolge molteplici funzioni: stimola l'attivazione del recettore per EGF e quindi la proliferazione cellulare; attiva la trasduzione del segnale per la mitosi tramite fattori di trascrizione come c-jun e c-fos, inattiva la p21 e previene inoltre l'apoptosi in seguito a danno al DNA [5]; impedisce il trasporto di complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) classe I e classe II. L'assenza di MHC I e/o II dalla superficie cellulare potenzialmente provoca il mancato riconoscimento delle cellule trasformate da parte dei linfociti CD4 e/o CD8 rispettivamente [6].

E6: codifica per una proteina basica costituita da 150 aminoacidi; strutturalmente E6 presenta due strutture “zinc-fingers” e due domini Cys-X-X-Cys. La proteina interagisce con numerose proteine cellulari e interferisce con la loro funzione. Queste proteine appartengono a quattro gruppi generali: fattori di trascrizione, proteine pro-apoptotiche, proteine coinvolte nella formazione e mantenimento della architettura cellulare, polarità e adesione, e fattori di replicazione e riparo del DNA. Dato che parecchie proteine appartengono a più di un gruppo, E6 è capace di sovvertire numerose funzioni cellulari. L’attività più studiata di E6 è la sua abilità ad indurre la degradazione della proteina p53. E6 forma un complesso con un’altra proteina cellulare, la E6-AP (E6 associated protein). Questo complesso si comporta da ubiquitina-ligasi favorendo l’ubiquitinazione della p53 e la sua proteolisi a carico dei proteosomi. Poiché compito primario di questa anti-oncoproteina è bloccare il ciclo replicativo in fase G1 e promuovere l’apoptosi di cellule che abbiano subito lesioni genomiche, la sua proteolisi E6-indotta si traduce in una prolungata sopravvivenza delle cellule infettate e in una loro maggiore proliferazione.

Recentemente è stato dimostrato che E6 regola p53 anche indirettamente, associandosi a fattori di regolazione trascrizionale, come p300 e CBP (CREB-binding protein) per inibirne la trascrizione [7]; E6 può interferire con la via apoptotica grazie alla sua associazione con Bak, un membro della famiglia Bcl-2, che esercita funzioni pro-apoptotiche. Analogamente agli effetti indotti su p53, E6 induce la degradazione di Bak in modo ubiquitina-dipendente [2] [8].

E6 presenta anche un’attività importante per l’immortalizzazione di cellule umane attraverso l’interazione con proteine della famiglia dei PDZ (protein domain Z); queste proteine sono importanti per il mantenimento dell’architettura molecolare al fine di rendere possibile la trasmissione del segnale. L’unione all’estremità C-terminale delle proteine E6 ad alto rischio porta alla loro degradazione.

Un altro bersaglio cellulare di E6 è la paxillina, una proteina coinvolta nella trasduzione di segnali provenienti dalla membrana plasmatica e diretti al citoscheletro di actina [4]. Solo le proteine E6 dei tipi ad alto rischio sono in grado di legare la paxillina. Si pensa che questa interazione abbia un ruolo fondamentale nel processo di carcinogenesi promossa dall’infezione con HPV ad alto rischio.

Recentemente si è visto che le proteine E6 dei tipi ad alto rischio possono attivare la trascrizione della subunità catalitica della telomerasi hTERT (human telomerase reverse transcriptase) attraverso l'azione combinata di Myc e Sp1, evento chiave nell'immortalizzazione dei cheratinociti primari [9].

È stata dimostrata un'ulteriore interazione tra E6 e l'interferon regulatory factor-3 (IRF-3), un regolatore trascrizionale positivo del promotore dell'interferone (IFN), il quale si attiva in risposta ad infezioni virali. Il legame E6/IRF-3 inibisce la funzione di transattivazione di IRF-3 e questo potrebbe spiegare la capacità degli HPV ad alto rischio di eludere la risposta immunitaria nelle cellule infettate [10].

E7: È una fosfoproteina acida di circa 100 aminoacidi, a localizzazione nucleare e citoplasmatica, e presenta tre domini: CR1, CR2, CR3. Studi hanno dimostrato che CR3 contiene due domini a zinc finger e sequenza C-X-X-C, essenziali per la stabilità della proteina.

E7 è importante per l'immortalizzazione delle cellule, ma per stabilire un'efficiente immortalizzazione di cheratinociti umani si richiede l'azione combinata di E6 ed E7 [11].

E7 interagisce con numerose proteine cellulari: fattori di trascrizione e proteine che rimodellano la cromatina, regolatori negativi del ciclo cellulare, e componenti della risposta immunitaria innata [2].

Il ruolo principale di E7 riguarda la sua capacità di associarsi alle proteine appartenenti alla famiglia del retinoblastoma (Rb): pRb, p107 e p130.

Normalmente nel nucleo delle cellule in fase G1 la proteina pRb forma complessi con l'eterodimero E2F e con altri fattori che attivano la trascrizione dei geni richiesti per l'avvio della fase S bloccandone l'azione. Se la cellula riceve uno stimolo proliferativo, la pRb viene iperfosforilata da alcune chinasi ciclino-dipendenti (Cdk4/6- D) e si distacca dai fattori di trascrizione che, liberi di agire, promuovono la replicazione del DNA. Interagendo con la pRb ipofosforilata, la proteina E7 recluta Rb con conseguente attivazione costitutiva dei geni bersaglio di E2F; queste attivano la trascrizione consentendo alla cellula ospite di procedere lungo il ciclo replicativo anche in assenza di stimoli mitogeni esterni [12].

Gli altri due membri della famiglia del retinoblastoma, p107 e p130, sono coinvolti nel controllare diversi punti durante le fasi del ciclo cellulare. p130

esercita la sua funzione regolatoria durante la fase G0/G1, mentre p107 è attiva nella transizione G1/S.

Analogamente a pRb, il polipeptide E7 si lega a p107 e p130, inattivando diversi punti del ciclo cellulare in cui queste proteine sono coinvolte; ma ancora non è chiaro se l'associazione tra E7 e p107 e p130 porti alla loro degradazione [12].

Altri meccanismi a cui E7 partecipa sono l'associazione con alcuni inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti, come p21^{Cip1} e p27^{Kip1}, provocando la perdita dei loro effetti inibitori sul ciclo cellulare. Cellule che esprimono E7 ed alti livelli di p21^{Cip1} o p27^{Kip1} sono ancora in grado di entrare in fase S, mentre in assenza di E7 le cellule si arrestano nella fase G1.

Un altro gruppo di proteine legate da E7 sono le istone-deacetilasi (HDAC): normalmente la proteina Rb lega le HDAC e le recluta a livello di promotori inducibili da E2F. Recentemente si è visto che E7 lega HDAC indipendentemente dal loro legame a RB (Figura 3) [13].

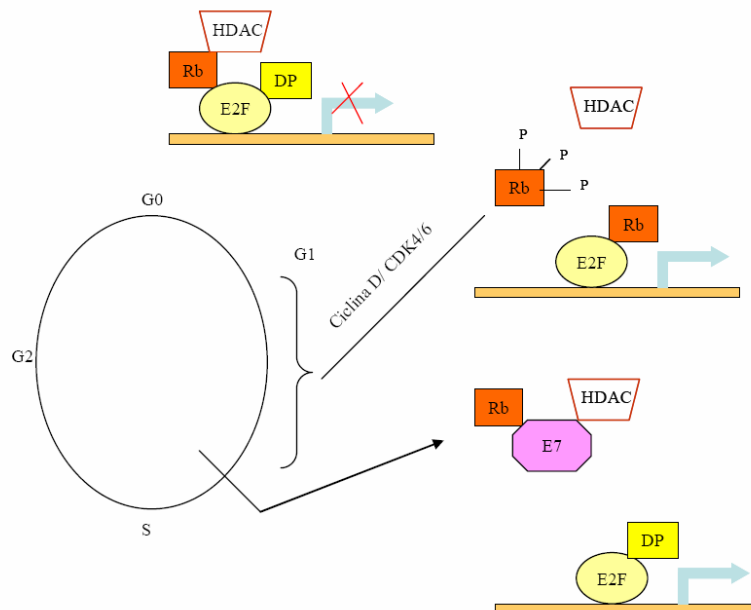


Figura 3: Meccanismo di regolazione del ciclo cellulare mediato dalle proteine Rb, HDAC e E2F/DP1

Una delle proprietà più particolari delle proteine E7 degli HPV ad alto rischio è la loro capacità di indurre instabilità genomica. Molti tipi di cancro positivi per il papillomavirus umano contengono diverse aneuploidie, ad indicare che variazioni nel numero di cromosomi sono eventi importanti nella progressione tumorale.

L'espressione di E7 è sufficiente ad indurre un aumento anomalo nel numero di cromosomi in cheratinociti umani primari [14]. Inoltre E7 si associa a IRF1 ("interferon regulatory factor 1"), la cui espressione è importante per la risposta del sistema immunitario e degli interferoni verso infezioni di papillomavirus persistenti [15]. Analogamente ad altri stimolatori della proliferazione, oltre alla capacità di alterare la regolazione del ciclo cellulare, E7 può promuovere l'apoptosi attraverso la via ubiquitina-dipendente. È interessante notare, inoltre, come la proteina E6 possa bloccare completamente l'attività pro-apoptotica di E7. Anche per questo motivo, per indurre la trasformazione completa delle cellule ospiti è necessaria l'attività sinergica di entrambe le proteine virali [5] [7] [16] (Figura 4).

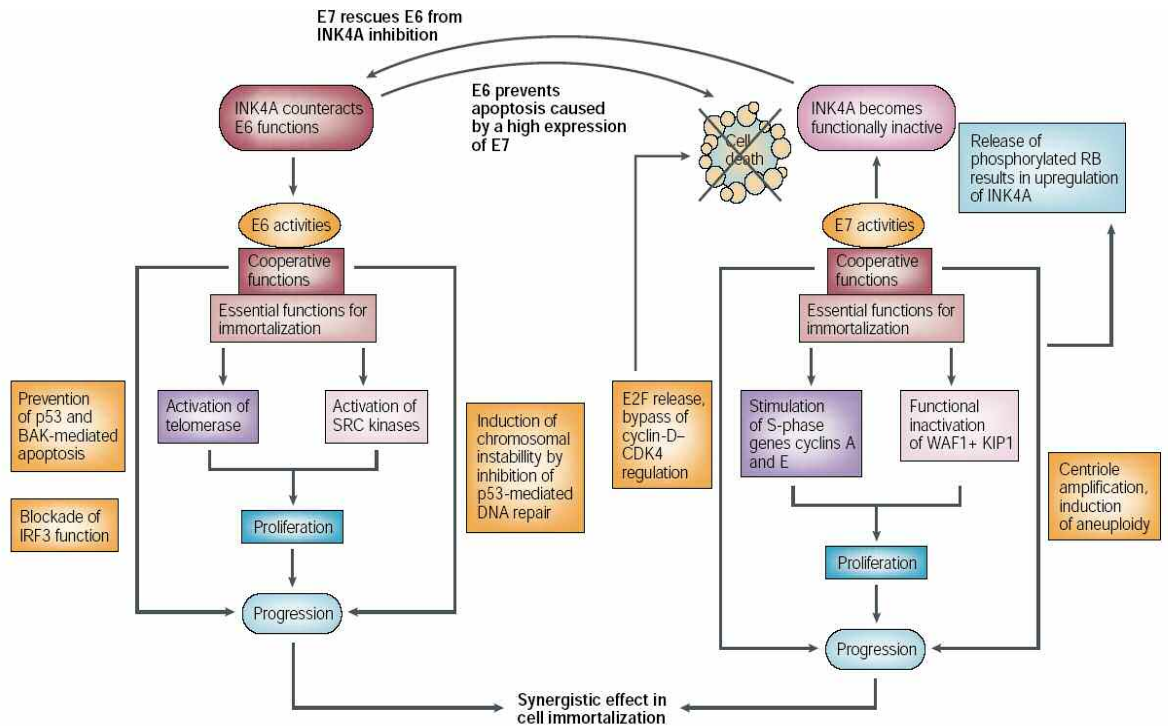


Figura 4. Funzioni delle oncoproteine E6/E7 (Zur Hausen, 2002).

L1/L2

I geni contenuti nella regione Late (L) codificano per proteine capsidiche. L1 è la proteina maggiore del capsido con peso molecolare 55-60 KDa, mentre L2 è la proteina minore con un peso di circa 70 KDa [17].

Il Capside è composto da 72 capsomeri. Ogni capsomero è un pentamero di 360 molecole di proteina L1 e da 12 a 36 molecole di proteina L2. La trascrizione di questi due geni dipende dallo stato di differenziazione del cheratinocita. L1 è la proteina maggiormente antigenica di HPV, è scarsamente fosforilata e può essere glicosilata; è coinvolta principalmente nel legame al DNA virale. L2 svolge principalmente ruoli di tipo strutturale, ma anche diverse funzioni regolatorie, tra le quali legame a recettori secondari; questa interazione avviene dopo il legame del capsido. Partecipa nella determinazione della localizzazione nucleare del virus e l'incapsidazione selettiva del DNA nel capsido virale [12].

1.2. CICLO VIRALE

L'infezione inizia con l'accesso delle particelle virali all'interno delle cellule dello strato basale; per alcuni tipi di HPV si pensa sia necessaria una soluzione di continuità dell'epitelio stratificato. Tale lesione può non essere visibile macroscopicamente e può crearsi quando la cute è esposta all'acqua, quando è abrasa o quando è sottoposta ad altre condizioni ambientali che favoriscono lo sviluppo di microtraumi. È stato suggerito che il virus debba infettare una cellula epiteliale staminale per mantenere nel tempo la lesione [18].

Esistono forti controversie sulla natura dei recettori cellulari di superficie che permettono l'iniziale adesione del virus alla cellula ospite, sebbene più studi abbiano dimostrato una certa dipendenza dalla presenza dell'eparina solfato [19]. Recenti lavori hanno suggerito che l'internalizzazione delle particelle virali sia un processo lento, e che possa avvenire attraverso l'endocitosi di vescicole rivestite di clatrina [20]; altri Autori sostengono che responsabile dell'ingresso del virus nella cellula infettata sia l'integrina $\alpha 4\beta 6$ [21].

La scapsidazione è facilitata dalla rottura dei legami disolfuro intracapsidici, permettendo al DNA virale di essere trasportato nel nucleo grazie a segnali di localizzazione nucleare, sebbene i processi di scapsidazione e di importazione nucleare del genoma virale rimangono tuttora ampiamente sconosciuti.

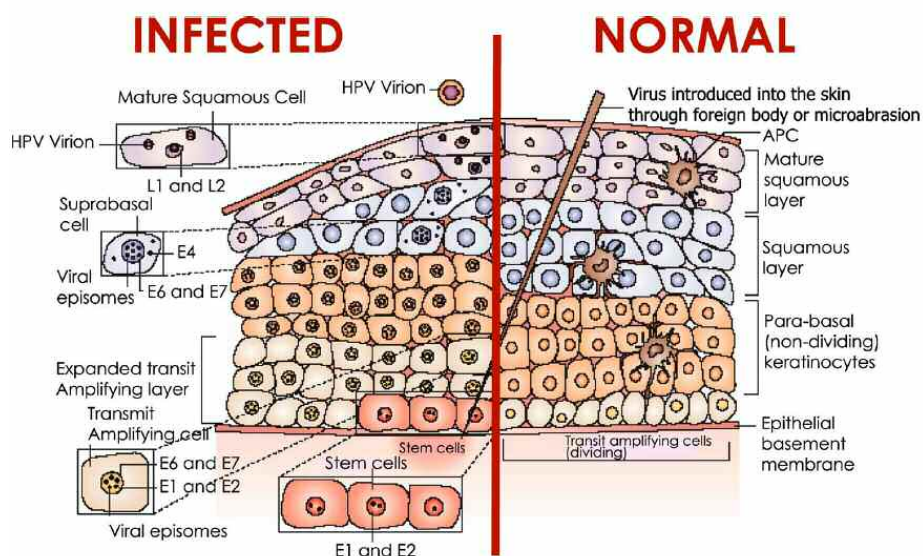


Figura 5. Ciclo virale del HPV (Frazer, 2004)

1.2.1. MANTENIMENTO DEL GENOMA

Il Papillomavirus mantiene il suo genoma in forma episomale nelle cellule basali dell'epitelio, che costituiscono l'unico strato in attiva divisione e replicazione. L'infezione da HPV di queste cellule porta all'attivazione a cascata dell'espressione dei geni virali che determinano una produzione di copie extracromosomiche (da 20 a 100 copie per cellula) di DNA virale [22]. L'espressione del pattern genico di queste cellule non è ancora ben definito, ma ricerche mirate affermano che le proteine virali E1/E2 sono espresse allo scopo di mantenere il DNA dell'HPV in forma episomale e di verificare la correttezza della segregazione genica durante la divisione cellulare. L'espressione di E1 e, probabilmente, di E2 sembra essere sufficiente al mantenimento basale degli episomi virali [12].

1.2.2. FASE PROLIFERATIVA

Nell'epitelio normale le cellule basali escono dal ciclo cellulare subito dopo aver migrato nello strato sopra basale, andando incontro al processo di differenziazione terminale; durante questo processo si verificano dei cambiamenti di struttura dei filamenti intermedi di cheratina e la secrezione di lipidi, fattori che permettono all'epitelio di superficie di creare una barriera fisica nei confronti dell'ambiente circostante [23].

Durante l'infezione da HPV, la proteina E7 (e forse anche E6) viene espressa in queste cellule, il blocco alla progressione del ciclo cellulare è abolito ed il processo di normale differenziazione terminale viene ritardato.

E6/E7 hanno entrambe alcune funzioni che stimolano la progressione del ciclo cellulare e sono associate ad alcuni regolatori di questo; E6 ed E7 lavorano in sinergia per raggiungere questi effetti e, nelle lesioni causate da HPV ad alto rischio come HPV 16, le due proteine sono prodotte a partire da un mRNA bicistronico, espresso dal promotore virale precoce p97.

1.2.3. AMPLIFICAZIONE GENICA

Per la produzione dei virioni, l'HPV deve amplificare il suo genoma e inserirlo all'interno delle particelle infettanti. Il promotore tardivo è localizzato all'interno dell'ORF (open reading frame) di E7 e si pensa che l'up-regulation di esso porti ad un'aumentata espressione di proteine coinvolte nella replicazione del DNA virale, tuttavia senza influenzare direttamente l'espressione delle proteine E6 ed E7, necessarie per l'entrata in fase S del ciclo cellulare.

L'amplificazione del genoma virale inizia in un piccolo gruppo di cellule del compartimento proliferativo e richiede l'espressione di tutti i geni precoci, inclusi E4 [12] [16] ed E5 il cui ruolo nella replicazione non è ancora completamente chiarito.

Il legame di E2 all'upstream regulatory region del Papillomavirus è necessario per la replicazione del DNA virale, e la formazione del complesso E1/E2 può permettere il procedere della replicazione stessa anche in assenza di sintesi cellulare di DNA.

Il meccanismo molecolare che porta all'attivazione del promotore tardivo e all'over-espressione del complesso E1/E2 non è ben conosciuto; sembra che questo promotore sia addirittura espresso in modo costitutivo in tutti gli stadi del ciclo virale.

Studi recenti suggeriscono che un modesto aumento dell'attività del promotore durante la differenziazione possa aumentare i livelli di E1 ed E2 (probabilmente anche di E4 ed E5), portando di conseguenza ad un incremento di copie geniche. Il genoma appena replicato servirà come modello per l'ulteriore espressione di E1 ed E2, espressione che faciliterà un' addizionale amplificazione del genoma virale [24].

1.2.4. ASSEMBLAGGIO DELLE PARTICELLE VIRALI

HPV codifica per due proteine strutturali, espresse negli strati più superficiali del tessuto infettato quando è stata completata l'amplificazione del genoma virale.

Le particelle di HPV sono costituite da un genoma di circa 8000 bp, posto all'interno di un capsido che contiene 360 copie della proteina maggiore L1 e da 12 a 36 copie della proteina minore L2. Quest'ultima si accumula attorno a strutture nucleari, conosciute come "PML bodies", durante l'assemblaggio del

virus, attraverso l'associazione ad un particolare fattore di trascrizione (Daxx) [25]; si pensa che i "PML bodies" siano i siti di replicazione del DNA virale e che le proteine L1/L2 vengano richiamate attorno ad essi per facilitare l'inserimento del DNA nel capsido (packaging). La proteina L2, inoltre, migliora l'efficienza del "packaging" e aumenta l'infettività virale. Infine, il virus deve uscire dalle cellule infettate e sopravvivere nell'ambiente extra-cellulare per un periodo di tempo variabile, prima di provocare una nuova infezione.

1.3. MECCANISMI PATOGENETICI

I meccanismi patogenetici degli HPV differiscono da quelli di altre famiglie virali in quanto l'infezione richiede cellule epiteliali proliferanti, situate nello strato basale dell'epidermide e delle mucose. In queste cellule l'espressione dei geni virali è limitata a specifici geni precoci, che inducono la cellula a proliferare. L'espressione di geni virali tardivi, con conseguente assemblaggio e rilascio del virione maturo, si verifica invece negli strati sovrastanti. Il ciclo replicativo completo del virus, con produzione di una progenie virale matura è tipica delle infezioni da HPV a basso o medio rischio, in cui il genoma permane in forma episomale.

Invece, nelle lesioni ad alto grado indotte dall'infezione da HPV ad alto rischio, quali HPV-16 e HPV-18, avviene l'integrazione del DNA virale nel DNA cellulare, con conseguente mancata produzione di una progenie virale completa (Figura 6).

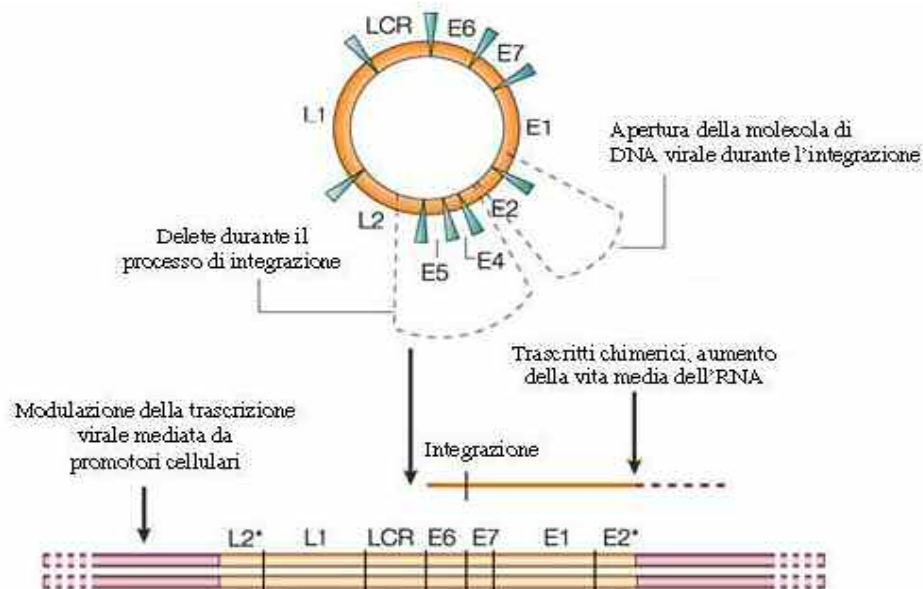


Figura 6: Meccanismo di integrazione del DNA virale in quello cellulare (Zur Hausen, 2002).

Tale integrazione è determinante nei meccanismi di trasformazione ed immortalizzazione cellulare, poiché si verifica a livello della ORF E2, con conseguente perdita dell'azione repressiva di E2 sulle oncoproteine virali E6 e E7, che svolgono un ruolo fondamentale nei meccanismi di tumorigenesi [13]. Pertanto nelle cellule dei tumori indotti da HPV ad alto rischio, i geni E1, E6 e E7 sono integrati e funzionali, con conseguente stimolo alla proliferazione cellulare, mentre i geni E2, E4 e E5 vengono persi o non sono trascritti (vedi paragrafo precedente).

1.4. CLASSIFICAZIONE DEI PAPILOMAVIRUS

Classificazione Filogenetica: sulla base della sequenza DNA della regione L1 ORF si definisce un genere quando l'omologia è del 60%. Ogni papillomavirus isolato dalla stessa specie è definito come nuovo tipo quando il genoma differisce più del 10%, differenze fra 2% e 10% definiscono un sottotipo, e differenze inferiori al 2% una variante [1]. Così la famiglia Papillomaviridae è divisa in 12 generi, di cui 5 appartengono ai papillomavirus umani (Alpha, Beta, Gamma, Mu, e Nu); nel genere alpha si raggruppano principalmente quelli che hanno un

tropismo specifico per l'epitelio mucoso; Beta, Gamma, Mu, e Nu hanno un tropismo per gli epitelii cutanei.

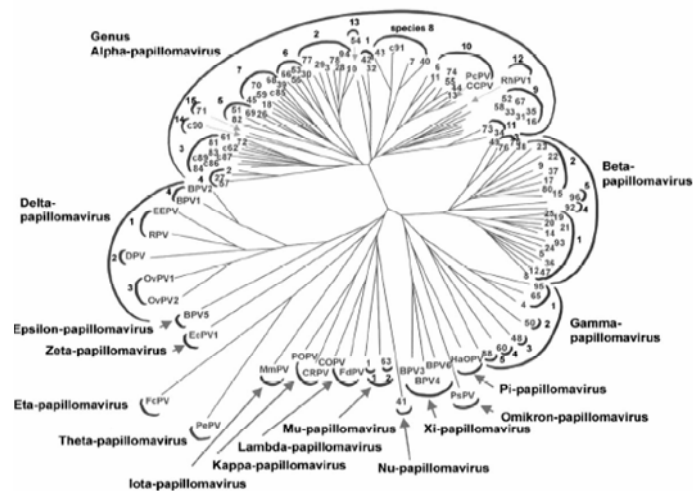


Figura 7. Classificazione filogenetica dei HPV (De Villiers et al., 2004)

Classificazione Epidemiologica: gli HPV sono suddivisi in virus ad alto rischio oncogeno e basso rischio oncogeno sulla base delle lesioni a cui sono associati [26].

Tabella 1. Classificazione epidemiologica (Munoz 2003).

Gruppo di HPV	Genotipo di HPV
Alto rischio	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Probabilmente ad alto rischio	26, 53, 66, 68, 73, 82
Basso rischio	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108

I tipi ad alto rischio sono implicati nella carcinogenesi dei tumori del collo dell'utero e di altri tumori del tratto ano-genitale ed altre mucose, i tipi probabilmente ad alto rischio sono rilevabili soprattutto in lesioni di alto grado e carcinoma ma il numero dei casi non è ancora sufficiente per essere inseriti nel gruppo ad alto rischio, mentre quelli a basso rischio si associano quasi esclusivamente a lesioni benigne come i condilomi genitali.

Analizzando i risultati di studi condotti in varie parti del mondo, lo IARC (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro) ha più recentemente

identificato ufficialmente i tipi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66 come agenti cancerogeni, mentre i tipi HPV 6 e HPV 11 sono considerati possibilmente cancerogeni per la specie umana [27].

Classificazione in base al Tropismo del virus: sono suddivisi in due grandi categorie, HPV cutanei ed HPV mucosali.

HPV cutanei causano lesioni cutanee come le verruche comuni o volgari (sono le forme più diffuse), si localizzano frequentemente a livello delle mani e dei piedi; un'altra parte dei tipi HPV cutanei si associano con la epidermodisplasia verruciforme.

HPV mucosali causano diversi tipi di lesioni a carico del tratto genitale sia nelle donne che negli uomini; HPV 6 e HPV 11, appartenenti ai tipi a basso rischio, portano alla formazione di condilomi acuminati (verruche benigne), mentre i tipi ad alto rischio sono riscontrati in lesioni squamose intraepiteliali che possono progredire verso il carcinoma squamoso invasivo.

Altre zone del distretto ano-genitale frequentemente associate ad infezione da HPV sono il pene, la vagina, la vulva e l'ano.

Recentemente è stata evidenziata la presenza di HPV ad alto rischio anche in carcinomi del distretto testa-collo, in particolare cavo orale ed orofaringe [28].

1.5. VIE DI TRASMISSIONE

1.5.1. Orizzontale

Sessuale: si verifica a livello cervicale, vulvare, vaginale e perianale; una grande importanza ha anche il tipo di pratica sessuale come sesso orale, pene-ale (caso degli omosessuali). Occasionalmente, le infezioni ano-genitali sono trasmesse digitalmente da un sito dell'epitelio all'altro.

Non sessuale: per mezzo di fomite come abiti contaminati, strumento medico.

1.5.2. Verticale

L'infezione si può trasmettere al neonato al momento del parto. Se il neonato viene infettato dai tipi di HPV 6 e 11, può sviluppare la Papillomatosi Respiratoria Ricorrente o Papillomatosi Laringea Giovanile.

1.6. STORIA NATURALE

La storia naturale dell'infezione genitale da HPV è fortemente condizionata dall'equilibrio che si instaura fra ospite ed agente infettante. Nella maggior parte dei casi, infatti, il virus viene eliminato dalla risposta immunitaria dell'ospite prima di sviluppare un effetto patogeno; in altri casi può restare latente o andare incontro a replicazione provocando una lesione a livello genitale che, se non regredisce spontaneamente, può manifestarsi attraverso diverse forme cliniche. Circa l'80% delle infezioni sono transitorie asintomatiche e guariscono spontaneamente grazie alla risposta immunitaria cellulo-mediata; il periodo medio di regressione di un'infezione da HPV è 6-18 mesi, come risulta in diversi studi [29]. La persistenza dell'infezione è invece la condizione necessaria per l'evoluzione verso il carcinoma; i genotipi di HPV ad alto rischio hanno una maggiore probabilità di infezione persistente. L'età è un altro fattore importante: la probabilità di infezione persistente aumenta dopo i 35 anni [30]. Il periodo che intercorre fra l'infezione e l'apparizione dei primi segni clinici varia da 1-10 anni. Solo una piccola percentuale (<5%) delle donne che hanno acquisito un'infezione sviluppa il tumore [30].

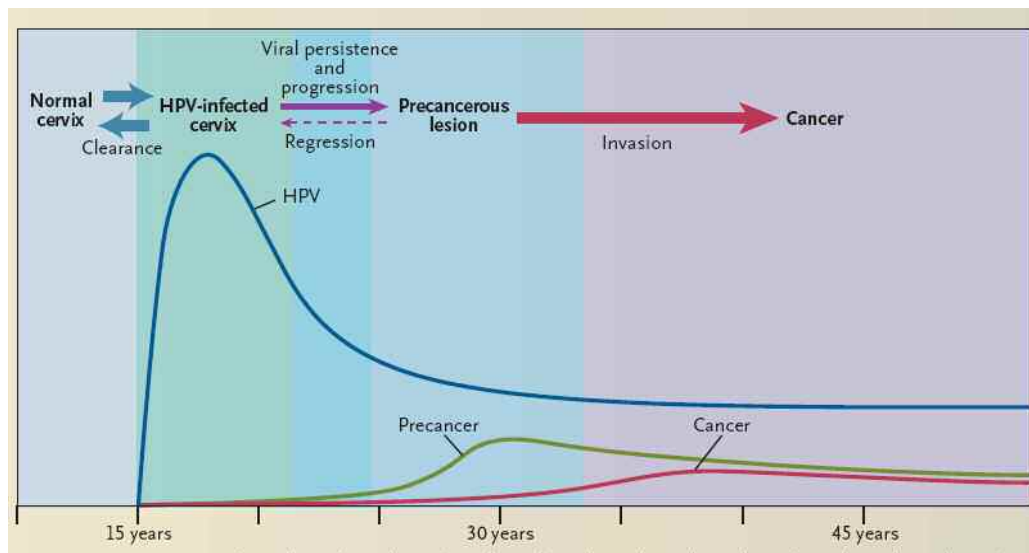


Figura 8: Storia Naturale dell'infezione da HPV (Schiffman, 2007).

1.7. COFATTORI

L'infezione persistente da HPV ad alto rischio oncogeno è ormai stabilita come la causa necessaria, anche se non sufficiente, per lo sviluppo del tumore della cervice. Ci sono diversi cofattori che contribuiscono ad aumentare il rischio.

1.7.1. FATTORI CHE APPARTENGONO ALL'OSPITE:

- L'attività sessuale. Diversi studi hanno stabilito che l'età precoce al primo rapporto sessuale, il numero elevato di partner sessuali, un'elevata promiscuità sessuale del partner incrementa fino a dieci volte il rischio [31].
- L'utilizzo a lungo termine (più di 5 anni) di contraccettivi orali, (progesterone e estrogeno) è associato con lo sviluppo di lesioni preneoplasiche e cancro della cervice [32].
- Un altro cofattore è il fumo di sigaretta. Diversi studi dimostrano l'influenza sull'incidenza e persistenza delle infezioni da HPV in donne fumatrici [31] [32].
- Gravidanze multiple (5, 7 o più bambini) sono un fattore di rischio tra donne che presentano infezione da HPV [33].
- La co-infezione con altri virus a trasmissione sessuale come CMV, HHV-6, HHV-7 e HSV-2 può indirettamente modificare le barriere dell'epitelio e intervenire nel processo di infiammazione cervicale.
- Predisposizione genetica. La presenza di particolari antigeni leucocitari umani (HLA), come HLA-DQB1*03 (DQ3), conferisce maggiore rischio di sviluppare cancro alla cervice uterina. Allo stesso modo, pazienti con HLA-B7 tendono a sviluppare carcinomi più aggressivi con una prognosi peggiore. L'antigene HLA-II Dqw3 è espresso dal 67-88% delle donne con cancro alla cervice, mentre solo dal 50% della popolazione di controllo [34].
- Condizioni d'immunodepressione, come nel caso di infezione da HIV. Numerosi studi hanno evidenziato una maggiore prevalenza di infezione da HPV e di lesioni della cervice nelle donne sieropositive rispetto alle

donne sieronegative. Tali lesioni presentano nelle pazienti HIV-positivie una maggiore tendenza alla persistenza e alla progressione a carcinoma invasivo [35]. L'infezione da HIV interviene nella patogenesi dei papillomavirus soprattutto mediante l'effetto immunodepressivo che riduce la risposta immune cellulo-mediata e favorisce la persistenza dell'infezione da HPV, ma sono stati evidenziati anche meccanismi di interazione diretta, quali la produzione da parte delle cellule infette di citochine come l'IL6 che andrebbe a modulare l'espressione dei geni dell'HPV nei cheratinociti infetti. Anche soggetti con un difetto nell'immunità cellulo-mediata (da linfociti T) e soggetti trapiantati sottoposti a terapia immunosoppressiva dimostrano di essere molto suscettibili all'infezione da HPV e alle loro complicanze [36].

- Abitudini alimentari. Acido folico, vitamine B, C, E e B12 α -carotene hanno un ruolo protettivo [37].

1.7.2. FATTORI VIRALI:

- Tipo. La maggioranza delle infezioni da HPV a basso rischio tendono a regredire spontaneamente senza causare lesioni, invece la presenza di tipi ad alto rischio, come HPV 16 e HPV 18, è spesso associata a lesioni precancerose e ai carcinomi invasivi.
- Carica virale. Diversi studi hanno mostrato che pazienti con alta carica virale di HPV ad alto rischio possono avere un rischio aumentato di sviluppare il cancro della cervice. È importante anche l'integrazione del virus nel DNA dell'ospite [38].
- Varianti virali. Sulla base di variazioni di sequenza soprattutto della regione E6 del genoma virale è stato possibile individuare cinque varianti filogenetiche di HPV-16: europeo (E), asiatico (As), asiatico-americano (AA), africano-1 (Af1) e africano-2 (Af2). Varianti genetiche di HPV 16 possono essere associate ad un differente potenziale oncogeno; la variante asiatica-americana, a causa dell'aumento dell'attività trascrizionale e delle variazioni a livello delle sequenze, presenta un'attività maggiormente

oncogeno rispetto alla variante europea [39] e la mutazione L83V (variante europea), che potenzia l'attivazione della via MAPK, favorisce la progressione neoplastica.

1.8. ASPETTI CLINICI DELLE INFEZIONI DA HPV

1.8.1. MANIFESTAZIONI CLINICHE

Il virus del papilloma causa numerose patologie. Si distinguono lesioni cutanee, lesioni mucose benigne e lesioni mucose maligne (Tabella 2).

LESIONI CUTANEE Le verruche comuni o volgari sono le forme più diffuse e si manifestano in forma di papule bianche-grigiastre o brune, piatte o rilevate, che si localizzano più frequentemente a livello delle mani e della pianta dei piedi. I genotipi degli HPV più frequentemente riscontrati in verruche sono i tipi 1, 2, 3, 4 e 7. La maggior parte dei restanti tipi cutanei degli HPV (i genotipi 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 47, 49) è stata ritrovata nelle lesioni della epidermodisplasia verruciforme (EV), caratterizzata dalla diffusione delle lesioni da HPV in gran parte della superficie corporea, simili a verruche piane e macule rossastre, che si manifestano in soggetti con profonde alterazioni dell'immunità cellulare. Non è infrequente la degenerazione in carcinoma a cellule squamose. Tra gli HPV di tipo cutaneo, i genotipi 5 e 8, e meno frequentemente 14, 17, 20 e 47, sono stati identificati in carcinomi a cellule squamose.

LESIONI MUCOSE BENIGNE Comprendono prevalentemente condilomi acuminati e piani, che sono conseguenti a trasmissione sessuale del virus e insorgono a livello dei genitali femminili e maschili, dell'uretra, dell'area perianale e dell'ano. Si manifestano come masse esofitiche verrucose di consistenza molle (condilomi piani) o modestamente rilevate (condilomi acuminati). Sono generalmente associati ad infezioni dei genotipi 6 e 11 di HPV (a basso rischio) e non portano quasi mai a cancro. La maggior parte delle lesioni è asintomatica e si può risolvere spontaneamente in 3-4 mesi, rimanere invariata o aumentare di dimensione e numero. La papulosa Bowenoid, causata da HPV-16 e HPV-18, comprende verruche di colore rosso-marrone e devono essere sottoposte a biopsia; dal punto di vista istologico possono presentare la stessa configurazione delle

neoplasie intraepiteliali. Altre sedi mucose infettate dagli HPV, caratterizzate da lesioni benigne di tipo papillomatoso, si trovano a livello respiratorio, congiuntivale e orale.

LESIONI MUCOSE MALIGNI Sono caratterizzate da lesioni squamose intraepiteliali (SIL) che si manifestano con grandi cellule arrotondate con atipie nucleari e aloni perinucleari dette coilociti. Le SIL sono suddivise in SIL a basso grado (LGSIL) e SIL ad alto grado (HGSIL). A livello di vagina, vulva, ano e pene si riscontrano lesioni simili: neoplasie intraepiteliali vaginali (VAIN), vulvari (VIN), anali (AIN) e peniene (PIN). Secondo la classificazione istologica si distinguono tre gradi di neoplasia intraepiteliale cervicale (CIN): CIN1 (lieve, corrisponde a LGSIL), CIN2 (moderata, corrisponde ad HGSIL), CIN3 (grave, corrisponde ad HGSIL). Nelle LGSIL si riscontrano sia tipi di HPV a basso che ad alto rischio oncogeno. La maggior parte delle lesioni di basso grado mantiene il virus in forma episomale e sostiene un ciclo di replicazione completo: sono espressi anche geni tardivi e originano particelle virali complete. Le HGSIL sono prevalentemente associate ad HPV ad alto rischio, che non possono però compiere un ciclo di replicazione completo, a causa di difetti differenziativi tipici di queste lesioni [27].

Tabella 2. Associazione tra genotipo e manifestazione clinica

Tipo di lesione	Genotipi di papillomavirus
Lesioni cutanee	
Verruche volgari, piane palmari	1, 2, 3, 4, 7, 10, 27, 28, 29, 41
Verruche in soggetti con Epidermodisplasia verruciforme (EV)	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 47, 49
Carcinomi cutanei in soggetti con EV	5, 8, 14, 17, 20, 47
Lesioni mucose	
Papillomi delle vie respiratorie	6, 11
Papillomi congiuntivali	6, 11
Lesioni della mucosa orale	
Iperplasia focale epiteliale	13, 32
Lesioni sulle labbra	2
Carcinoma oro-faringeo	16, 33
Lesioni mucose ano-genitali	
Condilomi acuminati e piani	6, 11, 42, 43, 44, 54, 55
Papulosi Bowenoide	16
Condiloma gigante	6, 11, 16
Lesioni displastiche:	
basso grado	6, 11, 42, 43, 44
alto grado	16, 18, 45, 56, 58, 31, 33, 35, 51, 52
Carcinomi della cervice uterina	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68
Cancro anale	16
Cancro vulvare	16

1.8.2. EPIDEMIOLOGIA

Le infezioni da papillomavirus umano (HPV) rappresentano una tra le cause più comuni delle malattie sessualmente trasmesse diffuse in tutto il mondo; si stima che circa il 75% delle persone contrae il virus almeno una volta nella vita: l'infezione interessa sia donne che maschi, soprattutto nella fascia giovanile, all'inizio dell'attività sessuale. Nella maggioranza dei casi l'infezione è di tipo transiente e il virus viene eliminato dal sistema immunitario senza provocare lesioni. L'infezione persistente da HPV, invece, è ormai stata definitivamente stabilita essere un fattore necessario, anche se non sufficiente, per lo sviluppo del carcinoma della cervice [40].

Recenti dati epidemiologici e patologico-molecolari forniscono l'evidenza per associare l'infezione da HPV ad alto rischio anche con altre patologie sia nel distretto ano-genitale, come pene, vagina, vulva e ano, che nel distretto testa-collo e orofaringe (Tabella 3) [41].

Tabella 3. Prevalenza dei carcinomi HPV correlati nei diversi distretti

Carcinomi	Istologia	% HPV Correlati
Cervice		99,7%
Vulva	basaloide	60%-90%
	cheratinizzante	< 10%
Vagina		64%-91%
Ano		88%-94%
Pene	basaloide	60%-90%
	cheratinizzante	<10%
Orofaringe		12%-36%
Cavità Orale		3%-23%

PREVALENZA

La prevalenza dell'infezione da HPV a livello della cervice uterina in donne sessualmente attive varia in relazione all'area geografica ed all'età: mostra un picco a 20-25 anni e decresce con l'età; si osserva una riattivazione dopo la menopausa per fattori ancora non chiari come: comportamento sessuale (nuovo partner), cambiamento ormonale, riattivazione di infezione latente. La prevalenza dell'infezione da HPV a livello della cervice uterina nelle donne con citologia

normale è intorno al 10%, in donne con lesioni di basso grado è del 71.6%, la prevalenza aumenta nelle donne con lesioni di alto grado (84%) e con carcinoma della cervice (99.7%) [40] [42].

La prevalenza dei tipi di HPV nei carcinomi della cervice varia nelle diverse aree geografiche analizzate; HPV 16 è il genotipo più comune in tutti i Paesi, HPV 18 rappresenta il secondo genotipo per frequenza (insieme sono responsabili del 70% dei casi di cancro della cervice), seguito dai tipi 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56 come dimostrano i risultati di due studi condotti in diverse parti del mondo su 3035 e 14500 casi, rispettivamente [43] [44].

INCIDENZA

Il carcinoma della cervice costituisce la seconda causa di cancro nella donna, dopo il carcinoma della mammella, con 273,505 vittime ogni anno nel mondo.

Ogni anno sono riportati 493,243 nuovi casi, di cui l'83.1% in paesi in via di sviluppo: 68 000 in Africa, 77 000 in America Latina e 245 000 in Asia [42] [45].

Le aree a maggior rischio per lo sviluppo del tumore sono l'America centrale, l'America del sud, le zone sud-est dell'Africa, i Caraibi e le zone centro-sud dell'Asia, che presentano tassi medi d'incidenza che superano i 40 casi per 100.000 donne l'anno. Nei Paesi industrializzati l'incidenza è intorno a 17 casi per 100.000 donne l'anno (Figura 9); tra i paesi industrializzati, le differenze sono dovute prevalentemente alla forza dei programmi di screening e all'educazione sanitaria.

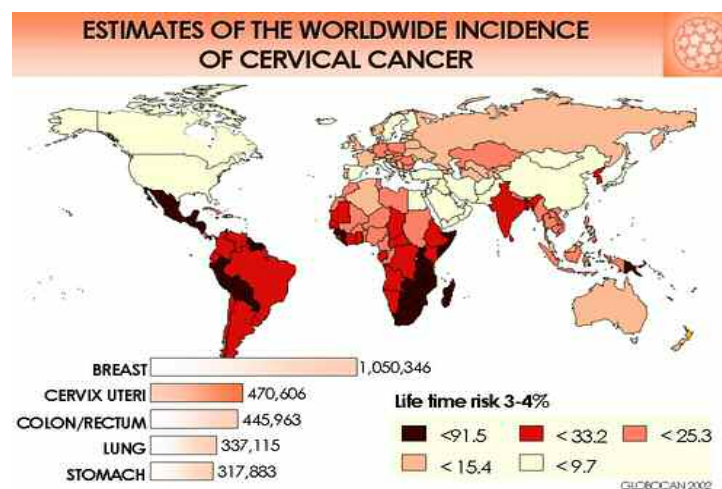


Figura 9: Incidenza del HPV nel mondo (Globocan, 2002).

L'Italia si trova in una posizione intermedio-bassa: 10° posto per incidenza e 13° per mortalità, con circa 3418 casi nuovi di carcinoma del collo dell'utero e 1186 decessi [45].

Come mostrano i dati dell'Associazione Italiana Registro Tumori nel rapporto 2006, l'andamento dell'incidenza e della mortalità mostra una tendenza costante alla riduzione. L'incidenza passa da 9,7 a 8,1 casi per 100.000 donne/anno, mentre la mortalità passa da 1,6 a 1 caso per 100.000 donne/anno, rispettivamente nel periodo 1988-1992 e nel periodo 1998-2002. La diminuzione dell'incidenza è a carico sostanzialmente delle forme squamo-cellulari, mentre si osserva una tendenza all'aumento degli adenocarcinomi.

1.9. METODOLOGIE DIAGNOSTICHE DELLE INFEZIONI DA HPV

La diagnosi di infezione da HPV si basa essenzialmente sull'utilizzo di: CITOLOGIA, COLPOSCOPIA, ISTOLOGIA, IMMUNOISTOCHEMICA e ANALISI DEL DNA.

1.9.1. CITOLOGIA

Le cellule epiteliali della cervice uterina infettate con HPV comunemente mostrano alterazioni citologiche e istologiche dovute a un distintivo effetto "citopatico virale".

La citologia cervicovaginale, più comunemente conosciuta come striscio vaginale o Pap test, è un test di screening per il cancro del collo dell'utero. Fu introdotto nella pratica clinica nel 1949 da George Papanicolaou. Il Pap test permette di identificare le lesioni precancerose e il cancro del collo dell'utero. Il prelievo delle cellule cervicovaginali è un esame semplice e non invasivo, è eseguito durante la visita ginecologica in maniera del tutto indolore. Si preleva dalla cervice uterina con spatola e cytobrush del materiale contenente cellule esfoliative che, strisciate su di un vetrino ed appositamente colorate, vengono poi osservate al microscopio. Un'altra modalità di raccolta delle cellule utilizza un mezzo liquido per la conservazione delle cellule (es. Thin Prep®). In questo caso le cellule sono raccolte in un apposito contenitore con una soluzione fissativa alcolica.

L'allestimento del vetrino avviene in maniera automatica utilizzando il processore Thin Prep. Con questo strumento le cellule in sospensione vengono raccolte tramite aspirazione sulla superficie di una membrana e poi trasferite su vetrino. L'utilizzo di questa metodica permette di raccogliere e preparare un vetrino di alta qualità in monostrato (strato sottile) senza interferenze, cioè un preparato libero da sangue e muco e da strati di materiale sovrapposto. Inoltre è possibile allestire un secondo campione dal liquido rimasto oppure utilizzare il materiale residuo per effettuare ulteriori indagini di approfondimento (ricerca DNA-HPV) senza dover richiamare la paziente.

La terminologia per classificare le alterazioni del Pap test si è sviluppata e modificata nel tempo.

Oggi la diagnosi citologica delle cellule cervico-vaginali viene fatta seguendo il Sistema Bethesda (TSB) del 2001 [46], che stabilisce una terminologia diagnostica uniforme e capace di favorire la comunicazione tra laboratorio e clinico. Le cellule della cervice vengono classificate come:

Tabella 4. Terminologia del sistema Bethesda 2001 per le cellule squamose

Normal cells	Cellule normali
LSIL Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion	Lesione squamosa intraepiteliale di basso grado
HSIL High-grade Squamous Intraepithelial Lesion	Lesione squamosa intraepiteliale di alto grado
ASC-US Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance	Cellule squamose atipiche di significato indeterminato
ASC-H Atypical Squamous Cells can't rule out High-Grade Lesions	Cellule squamose atipiche, non esclude SIL di alto grado
Carcinoma	Carcinoma
Adenocarcinoma	Adenocarcinoma

Tra le anomalie delle cellule squamose è compresa la lesione squamosa intraepiteliale, SIL, che descrive tutto lo spettro dei precursori del carcinoma invasivo associati ad HPV. Lo spettro di questi precursori, nel sistema TSB, è suddiviso in lesioni di basso grado LSIL (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion) e lesioni di alto grado HSIL (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion).

LSIL: la struttura dell'epitelio di origine è ben conservata; include la displasia lieve, il condiloma piatto e le CIN1.

La categoria delle cellule squamose include le ASC-US (cellule squamose di significato indeterminato). Questo gruppo comprende uno spettro di modificazioni cellulari e riflette i limiti dell'interpretazione al microscopio ottico delle alterazioni *borderline*. Si osservano degli ingrandimenti nucleari e anomalie citologiche di incerto significato insufficienti per formulare una diagnosi certa di lesione. Le condizioni istologiche che possono presentare questa difficoltà sono: l'iperplasia delle cellule basali, la metaplasia squamosa immatura, la metaplasia squamosa atipica, la riparazione (alterazioni epiteliali reattive), stati di basso estrogenismo, atrofia e l'epitelio sottile.

In modo analogo per la componente ghiandolare è stato coniato il termine AGUS (cellule ghiandolari atipiche di significato indeterminato).

HSIL: l'epitelio di origine è stato sostituito da cellule anormali di dimensioni più grandi. Mostrano alterato il rapporto nucleo citoplasma, i nuclei sono ingranditi e irregolari.

Anche se la citologia rappresenta il prototipo diagnostico delle campagne di screening del carcinoma della cervice, tuttavia per la sensibilità non ottimale e per la scarsa accuratezza diagnostica nel discriminare le lesioni a basso rischio oncologico deve essere affiancata da una metodica di secondo livello (livello successivo di approfondimento diagnostico) come colposcopia, biopsia o ricerca del DNA virale dell'HPV.

1.9.2. COLPOSCOPIA

La colposcopia è un esame che, grazie ad uno strumento ottico denominato colposcopio (costituito da una sorgente luminosa e un sistema di lenti) ed alcuni reagenti chimici (acido acetico e soluzione iodo-iodurata di Lugol), consente di osservare, ad ingrandimento e con un'intensa illuminazione, la superficie della vagina e dell'esocervice. Tale metodica è in grado di evidenziare le lesioni presenti e permette di effettuare una biopsia mirata.

1.9.3. ISTOLOGIA

Le alterazioni citopatiche virali sono state descritte per la prima volta nel 1956 con il termine di "atipia coilocitotica" per la loro somiglianza istologica alle comuni verruche cutanee. Solo venti anni dopo queste alterazioni cellulari sono state correlate ai condilomi piatti della cervice e in stretta associazione con l'infezione da HPV e le lesioni precancerose della cervice uterina: le CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia).

I coilociti sono cellule comunemente situate negli strati intermedi dell'epitelio con un ben definito e esagerato alone chiaro perinucleare con conseguente condensazione e marginalizzazione del citoplasma. I nuclei, non chiaramente displastici e privi di nucleoli, mostrano comunemente un ingrandimento nucleare di due o tre volte rispetto alle cellule intermedie, irregolarità della membrana, ipercromasia. Altre caratteristiche associate all'infezione da HPV sono le binucleazioni e i meganuclei presenti negli strati superficiali ed intermedi dell'epitelio della cervice.

I coilociti sono la norma delle CIN 1 diventando meno evidenti nelle lesioni di alto grado CIN2 e CIN3 [47].

La nomenclatura usata per descrivere istologicamente le condizioni precancerose della cervice uterina sono sottoposte ad un continuo dibattito per una sempre migliore definizione degli eventi patogenetici trasformanti che da epitelio normale portano al carcinoma. Dal termine di displasia lieve, moderata e severa, introdotto negli anni '60 in cui displasia definiva tutti i cambiamenti dell'epitelio squamoso di tutti i gradi fino al carcinoma in situ, negli anni 1970/1980 sono state proposte numerose alternative per descrivere questo complesso di alterazioni displastiche.

La più accettata è stata quella di CIN ed è stata divisa in tre gradi CIN 1, CIN 2, CIN 3 [48].

La suddivisione dei vari gradi di CIN si basa essenzialmente sull'analisi delle anomalie nucleari, dell'attività mitotica e della differenziazione e stratificazione degli epiteli (vedi Figura 10).

CIN 1

Nella CIN 1 i due terzi della stratificazione dell'epitelio mostra una sostanziale differenziazione sebbene nuclei atipici possano essere presenti nello spessore dell'epitelio. In questa categoria le caratteristiche diagnostiche sono concentrate in una piccola porzione dell'epitelio vicino agli strati basali. Le mitosi sono rare e confinate nella parte basale dell'epitelio e le alterazioni cellulari sono concentrate nella parte inferiore dell'epitelio con alterazioni cellulari simili all'infezione da HPV o al condiloma piatto.

CIN 2

Nella CIN 2 solo la metà dell'epitelio mostra differenziazione e maturazione, le anomalie nucleari sono più pronunciate rispetto alla CIN 1 sia quantitativamente che qualitativamente, con nuclei pleomorfi e irregolarità della membrana nucleare. Le figure mitotiche possono spingersi dallo strato basale fino ai 2/3 dell'epitelio.

CIN 3

Nella CIN 3 è assente ogni differenziazione maturativa in quasi tutto lo strato dell'epitelio e se presente è focale e limitata agli strati più superficiali.

I nuclei sono marcatamente ingranditi e pleomorfi con forme anche bizzarre, ipercromatici, mostrano un indice mitotico molto prominente, con mitosi atipiche anche localizzate nell'epitelio squamoso superficiale.

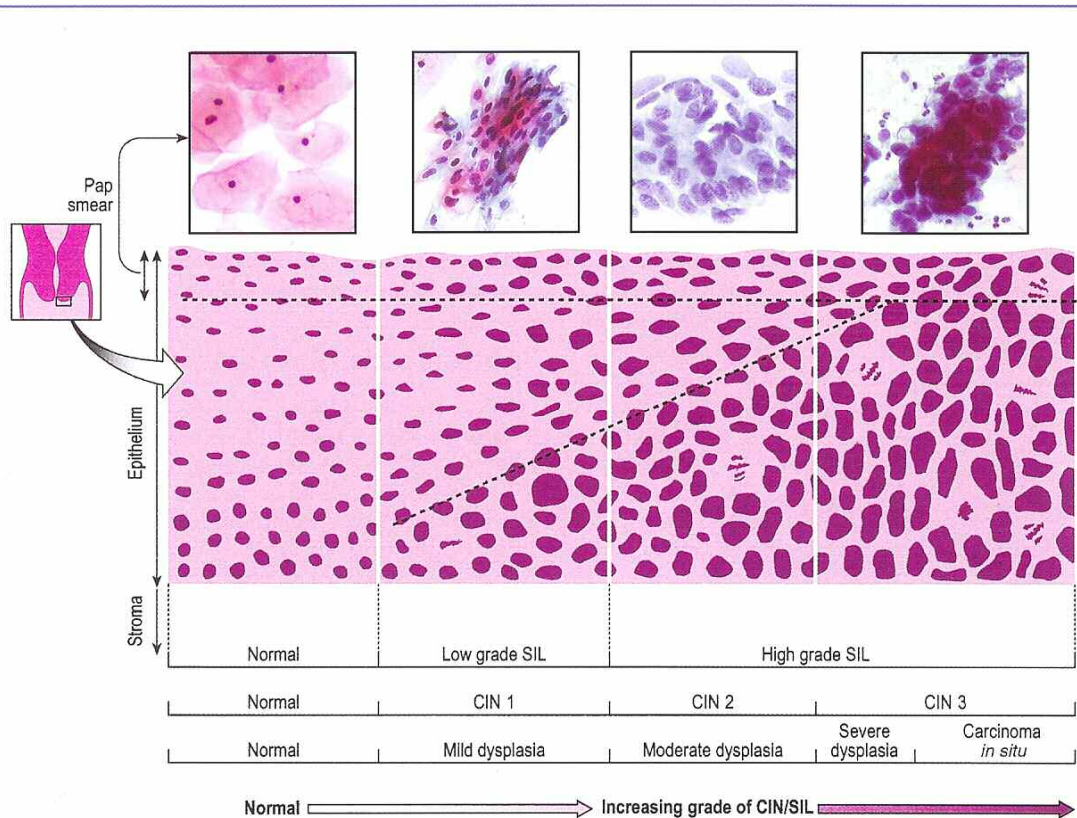


Figura 10. Condizioni precancerose della cervice uterina

1.9.4. IMMUNOISTOCHEMICA

I Papillomavirus umani non possono essere coltivati in vitro, in quanto si moltiplicano solo in cheratinociti differenziati. Le conseguenti problematiche nella produzione di proteine virali hanno reso molto difficile l'allestimento di test sierologici (che sono comunemente alla base della diagnostica virale).

Vengono utilizzati altri metodi che rilevano la presenza di proteine dei papilloma virus umani nelle cellule dell'epitelio cervicovaginale (cellule o tessuto): tale ricerca può essere effettuata tramite colorazioni immunocistochemiche.

I metodi immunocistochemici prevedono l'uso di anticorpi monoclonali o policlonali per la ricerca di antigeni presenti sul capsid virale. Possono essere eseguiti sia su sezioni istologiche che su materiale citologico fresco o fissato.

Queste metodiche risultano poco sensibili in quanto rivelano proteine capsidiche che vengono espresse solo nelle infezioni di tipo produttivo.

1.9.5. TEST MOLECOLARI

La diagnostica per la ricerca e la tipizzazione degli HPV si basa principalmente sulla ricerca del DNA virale con metodiche di tipo molecolare. Tre principali metodiche possono essere utilizzate: ibridizzazione diretta, amplificazione del segnale, amplificazione del target [49].

L'IBRIDIZZAZIONE DIRETTA: utilizza sonde opportunamente marcate che si legano in modo specifico (in determinate condizioni di temperatura e concentrazione salina) a sequenze omologhe contenute nel campione da analizzare; la reazione può avvenire o su supporto solido (membrane di nylon) contenente DNA estratto dal campione o direttamente sul campione appoggiato su vetrino. Il legame sonda – DNA del campione viene poi rivelato in base al tipo di marcatore utilizzato per la sonda.

Due sono le tecniche principali che sfruttano il principio dell'ibridizzazione diretta: il “Southern blot” e “l'ibridizzazione in situ”.

Il Southern blot è stato il primo metodo nello studio degli HPV ed è stato considerato per lungo tempo il “metodo di riferimento”. La metodica del Southern blot prevede la digestione del DNA, estratto dal campione, con enzimi di restrizione, i frammenti ottenuti vengono separati mediante elettroforesi, denaturati in situ e trasferiti su filtro di nitrocellulosa (verso il quale il DNA presenta alta affinità). Successivamente si aggiunge al sistema una sonda marcata con traccianti radioattivi, ed in seguito alla reazione di ibridazione (nella quale la sonda legherà il frammento di DNA ad essa complementare presente sul filtro di nitrocellulosa), si procede alla visualizzazione mediante autoradiografia. Il metodo risulta lungo e laborioso, richiede l'impiego di una grande quantità di DNA ad alto peso molecolare ma soprattutto, implica l'uso di materiale radioattivo [50].

L'ibridazione in situ permette la diretta determinazione del DNA virale nel materiale cellulare integro. I vantaggi di questa tecnica sono la precisa correlazione con la morfologia, la possibilità di studiare popolazioni cellulari eterogenee e di poter visualizzare anche una sola cellula infettata.

La procedura di rivelazione è analoga ad una reazione classica di immunocitochimica, come, ad esempio, in caso di probes biotilate la streptoavidina marcata con fosfatasi alcalina ed idoneo substrato per l'enzima.

Queste tecniche risultano poco utilizzate ai fini diagnostici e non applicabili su larga scala per scarsa sensibilità e riproducibilità.

AMPLIFICAZIONE DEL SEGNALE

La metodica più conosciuta di amplificazione del segnale non radioattiva è il kit commerciale Hybrid Capture II (HC2, Digene corp., USA).

L'Hybrid Capture II (HC2) si basa su una ibridazione in soluzione con mix di sonde per diversi tipi di HPV; permette di evidenziare, a seconda della mix usata, o 13 HPV ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39,45,51,52, 56, 58, 59, 68) o 5 HPV a basso rischio (6, 11, 42, 43, 44).

Il principio fondamentale di tale sistema è che il DNA di HPV, se presente, si lega con specifiche sonde a RNA, creando degli ibridi RNA:DNA molto stabili. Questi ibridi vengono catturati da anticorpi universali legati ad un fase solida (micropiastra). I complessi così formati vengono evidenziati con anticorpi monoclonali coniugati alla fosfatasi alcalina. Il segnale che ne risulta è amplificato di almeno 3000 volte e viene evidenziato con un substrato chemiluminescente e misurato da un luminometro. L'intensità di luce emessa, espressa in RLU (Relative Light Units), è proporzionale al quantitativo di DNA virale presente nel campione. Questa lettura fornisce un dato semiquantitativo sulla carica virale presente. È l'unico test HPV approvato del FDA (Food and Drug Administration, USA); non consente la definizione dello specifico tipo di HPV presente [51].

AMPLIFICAZIONE DEL TARGET

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è un'amplificazione enzimatica in vitro di una definita sequenza di DNA. In base alla sequenza di DNA che si vuole amplificare, indicata come DNA target, vengono sintetizzati due oligonucleotidi di DNA a singolo filamento, indicati come primers, complementari ai due estremi del segmento target. La lunghezza ideale di un primer è di 20-24 nucleotidi. I due primers non devono essere complementari fra di loro per non formare dimeri. Al loro interno non devono essere presenti sequenze complementari che potrebbero unirsi ad anello. La reazione di PCR è caratterizzata da una serie di cicli a diverse temperature. Ogni ciclo si compone di tre tappe e può essere ripetuto 20-40 volte:

1. denaturazione al calore del DNA;
2. annealing: i due primer si legano in modo complementare alle estremità 3' e 5' del DNA da amplificare;
3. estensione del filamento con Taq polimerasi.

L'amplificato si accumula in modo esponenziale fino a raggiungere un plateau. L'amplificato viene successivamente messo in evidenza mediante l'elettroforesi su gel. La PCR è una metodica molto sensibile, e permette di rivelare quantità minime di genoma virale. I primer possono riconoscere o sequenze conservate tra diversi tipi di HPV (primer consenso) [52] [53] [54] o sequenze specifiche di singoli tipi che identificano i tipi HPV sulla base di polimorfismi generalmente nelle regioni E6 e E7 (primers tipo-specifici).

Una volta che la reazione di amplificazione è avvenuta con l'utilizzo di primers consenso, l'identificazione dei genotipi HPV può essere eseguita con vari metodi, quali RFLP (restriction fragment length polymorphism), ibridazione inversa o Sequenziamento nucleotidico. L'RFLP identifica il tipo di HPV sulla base del pattern di bande di restrizione genotipo-specifico che si genera dopo digestione enzimatica dell'amplificato. L'ibridazione inversa (LIPA, line probe assay) identifica i DNA amplificati mediante ibridazione selettiva con oligonucleotidi immobilizzati su membrana. Il Sequenziamento diretto degli acidi nucleici amplificati permette l'assegnazione del genotipo mediante comparazione delle sequenze con le sequenze HPV note.

REAL TIME PCR. Questa tecnica è in grado di fornire sia un dato qualitativo che quantitativo, utile nella valutazione della carica virale dell'HPV. La metodica prevede il monitoraggio dei prodotti di amplificazione in tempo reale, estrapolando matematicamente i valori della concentrazione dalle curve di reazione generate durante il processo. Questa tecnica presenta un'elevata sensibilità ed è caratterizzata da alta riproducibilità [55] (Figura 11).

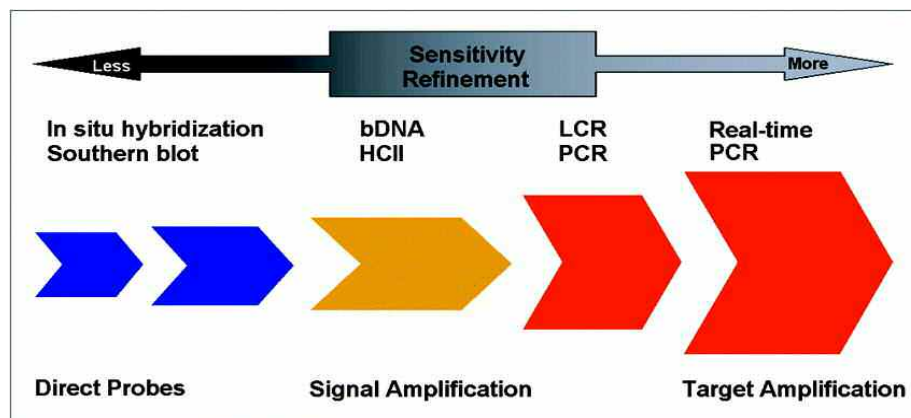


Figura 11: Sensibilità relativa alle tecniche di indagine per DNA HPV.

Altre metodiche di laboratorio per la valutazione dell'infezione da HPV sono l'analisi dell'espressione dei trascritti E6/E7. Ad esempio, il test commerciale **Pre Tect HPV Proofer** (Norchip, Alfawassermann) è una metodica che individua in real-time e mediante l'incorporazione di sonde marcate con fluorescenza, i genotipi di HPV 16, 18, 31, 33 e 45. Diversi studi hanno concluso che il test è riproducibile e che ha una buona specificità nell'identificare le lesioni CIN2+ [56].

P16 COME MARKER DI PROGRESSIONE ONCOLOGICA. Studi recenti hanno permesso di identificare un biomarcatore, la proteina p16, che viene iperespressa, nelle cellule cervicali displastiche e la cui iperespressione è direttamente correlata all'attività dell'oncogene E7 di HPV [57]; la rilevazione di p16 avviene tramite reazione immunochimica che colora il nucleo e/o il citoplasma delle cellule positive. Il significato diagnostico e prognostico che questa proteina può rivestire associato alla relativa facilità della metodica di rilevazione ed al basso costo, ha determinato in numerosi studi la sua utilizzazione per migliorare la qualità della diagnosi citologica ed istologica [58].

1.10. IMMUNITÀ E HPV

Il sistema immunitario è importante nel controllo delle infezioni da HPV. Sia la risposta immunitaria umorale che quella cellulo-mediata sono essenziali per la clearance delle infezioni cervicali associate ad HPV.

A livello dell'epitelio della cervice uterina troviamo: le cellule di Langerhans epidermiche (LC), i cheratinociti, le cellule endoteliali del derma e le cellule dendritiche (DC) dello stroma. La risposta immunitaria indotta dall'infezione da HPV comprende quella innata, che coinvolge macrofagi, neutrofili e citochine, quella adattativa, sia di tipo umorale che cellulo-mediata. Una volta avvenuto il contatto Antigene-LC, quest'ultima processa l'antigene, matura e migra verso i linfonodi, dove presenta l'antigene in contesto MHC II ai linfociti T CD4+, che sono la chiave dell'attivazione dell'immunità specifica. Numerosi studi hanno dimostrato che i linfociti T CD4+ riconoscono sia prodotti di geni precoci che tardivi; quale dei due tipi viene presentato dipende dalla capacità della molecola MHC nel legare l'uno o l'altro antigene [59] [60].

RISPOSTA UMORALE

Le cellule B mature rilasciano anticorpi antigene-specifici. La neutralizzazione è mediata da IgG sieriche e da IgA secretorie, rivolte verso antigeni di superficie del virus al fine di bloccare l'ingresso nelle mucose e prevenire nuove infezioni. Gli anticorpi circolanti e il complemento possono opsonizzare ed agglutinare le particelle virali, facilitando la fagocitosi da parte dei macrofagi. Però gli anticorpi non sono sempre in grado di eliminare il virus, soprattutto quando esso entra in uno stato di latenza, in cui il DNA virale è integrato in quello cellulare. L'intensità della sieroconversione dipende dalla carica virale e dalla sua persistenza. Non è chiaro se la risposta anticorpale sia sufficiente a proteggere le donne dall'infezione e se tale protezione sia duratura [59] [60].

RISPOSTA CELLULO-MEDIATA

La clearance di un'infezione naturale da HPV è promossa da una risposta immunitaria cellulo-mediata. I linfociti T CD4+, a seconda dell'antigene riconosciuto si differenziano in Th2 o in Th1. Th2 rilascia IL-4, IL-10 ed altre citochine che attivano la risposta umorale con maturazione dei linfociti B in plasmacellule. Th1 attiva l'immunità cellulo-mediata rilasciando INF- γ che a sua volta stimola i linfociti T CD8+, i macrofagi e le cellule natural killer (NK). Il bersaglio dei linfociti T citotossici sono le proteine precoci E2, E6 ed E7 [59] [60].

EVASIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA.

Gli HPV, in modo particolare i genotipi ad alto rischio oncogeno, hanno sviluppato una serie di meccanismi per evadere il sistema di difesa dell'ospite; in particolare, evasione della immunità innata e ritardo nella attivazione della immunità adattativa [60]. Diversi fattori contribuiscono a rendere meno efficace le risposta immunitaria:

1. gli HPV sono virus epitelio-tropici, infettano le cellule basali e attraverso il programma di differenziazione del cheratinocita arrivano alla superficie dell'epitelio prima di produrre le particelle virali. Come conseguenza non si verifica una fase viremica, non c'è infiammazione, e i cheratinociti non rilasciano citochine pro-infiammatorie;
2. i tipi di HPV ad alto rischio hanno sviluppato meccanismi di inibizione della sintesi dell'INF e della relativa catena di segnali ed in particolare le proteine oncogene E6 e E7 effettuano una down-regolazione dell'espressione dei geni $IFN\alpha$, abolendo la via di attivazione INF-dipendente;
3. non c'è stimolo per l'attivazione delle cellule dendritiche, la loro migrazione, la presentazione e la processazione dell'antigene.

1.11. TERAPIE

Gli obiettivi delle terapie verso le patologie associate a HPV sono: l'eradicazione delle infezioni, la guarigione dei sintomi e la prevenzione delle infezioni. Le terapie attualmente disponibili hanno raggiunto questi obiettivi solo in parte.

Infatti, non si tratta di terapie antivirali specifiche, ma di trattamenti ablativi che non risolvono l'infezione virale e il problema della trasmissione. Nella Tabella 5 sono presentate le principali metodiche terapeutiche.

Tabella 5. Principali metodi di terapia

CHIRURGICHE	Escissione
	Diatermocoagulazione
	Crioterapia
	Elettrocoagulazione
	Laser a CO ₂
FARMACOLOGICHE	Podofillina
	5-Fluorouracile
	Acido Tricloroacetico
ALTRE	Isoprinosina
	Immunomodulatori
	Interferone (alfa e beta)

VACCINI PROFILATTICI ANTI-HPV

I vaccini profilattici si basano sulla capacità di auto-assemblaggio della proteina capsidica L1 in particelle simili al virus (virus like particles, VLP), prive di attività infettiva per l'assenza del DNA virale, ma con la capacità di indurre una risposta immunitaria protettiva tipo specifica, come inizialmente descritto in vari modelli animali. Nel corso degli anni sono stati sviluppati e testati per immunogenicità, sicurezza ed efficacia in studi clinici randomizzati vari modelli vaccinali fino a registrare due tipi di vaccini commerciali; sono stati approvati da parte delle maggiori autorità regolatrici mondiali, la Food and Drug Administration (FDA) negli Stati Uniti, e la European Medicines Agency (EMA): Cervarix® e Gardasil®.

Il vaccino bivalente prodotto dalla Glaxo SmithKline (Cervarix®), contiene le proteine L1 di HPV 16 e 18, prodotte separatamente in cellule di insetto usando come vettore il baculovirus e poi combinate con l'adiuvante AS04 (idrossido di alluminio e monofosforil-lipide A). Va somministrato intramuscolo in tre dosi (tempo zero, uno e sei mesi).

Il vaccino quadrivalente Gardasil® prodotto dalla Merck & CO. contiene le proteine L1 di HPV 6, 11, 16, 18 espresse in *Saccharomyces pombe* e adiuivate

con alluminio idrossifosfato solfato amorfo (ASH4). Il prodotto si somministra intramuscolo al tempo zero, due e sei mesi.

I vaccini profilattici inducono la produzione di anticorpi neutralizzanti tipo-specifici, che prevengono l'infezione in chi non è ancora stato infettato. L'obiettivo principale dei vaccini profilattici è la prevenzione del carcinoma della cervice.

In Italia, il Ministro della Salute nel 2007 ha indicato la necessità di intervenire, in via prioritaria, con una campagna di vaccinazione gratuita per ragazze in età prepubere (12 anni) in modo da produrre una progressiva immunizzazione della popolazione giovane adulta esposta al rischio di infezione.

STUDI DI EFFICACIA

Entrambi i vaccini sono stati valutati in trials clinici randomizzati, su giovani donne, con un braccio di controllo con placebo. Dai dati pubblicati dei trials di fase II-III, entrambi i vaccini hanno dimostrato una efficacia molto elevata nel proteggere le vaccinate da infezioni cervicali persistenti per i tipi HPV 16 e 18 e dalle lesioni pre cancerose (CIN 2+) sostenute da HPV 16 e 18. Inoltre il vaccino quadrivalente protegge le donne anche dalle lesioni condilomatose indotte dagli HPV 6 e 11 [61] [62] [63].

VACCINI TERAPEUTICI

Il mantenimento dell'infezione e la progressione verso il cancro conclamato richiede la continua espressione delle oncoproteine virali E6 ed E7. Proprio per questo motivo, i vaccini terapeutici hanno lo scopo di stimolare la risposta immunitaria linfociti T-mediata contro queste molecole.

Allo stato attuale, sono in fase di studio differenti metodologie per la creazione di vaccini terapeutici, ad esempio la somministrazione di peptidi antigenici o proteine ricombinanti, vettori virali e cellule dendritiche presentanti E7 come antigene.

Recenti studi hanno inoltre mostrato il possibile uso di cellule dendritiche caricate con HPV E7 come "vaccino" in grado di stimolare una risposta immunitaria citotossica che controlli le cellule del cancro della cervice. I risultati dei trials clinici non sono ancora chiari e i vaccini finora testati non hanno un'efficacia

accettabile. La via quindi per la realizzazione di un vaccino terapeutico è ancora lunga e ci vorranno ancora molti anni di ricerca prima che possa essere realizzato.

SCOPO DELLO STUDIO

L'identificazione del Papillomavirus (HPV) come causa necessaria per lo sviluppo del carcinoma della cervice e la rilevazione dei diversi tipi di HPV con diverso potenziale oncogeno mediante tecniche molecolari hanno reso possibile lo studio di nuove strategie nello screening (trriage, test primario) basate su test molecolari che possono permettere di individuare con maggiore accuratezza le donne a rischio di sviluppare una lesione di alto grado o un carcinoma invasivo della cervice uterina.

Le donne che presentano un quadro citologico di ASC-US (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) vengono attualmente sottoposte ad approfondimenti diagnostici (ripetizione Pap Test, colposcopia ed eventuale biopsia, e stretto follow-up) in quanto circa il 10% dei casi sviluppano una lesione di alto grado (CIN2+). E' stato dimostrato che sequenze HPV di tipi ad alto rischio sono quasi sempre presenti nei casi di ASC-US associati a CIN 2+, mentre i casi negativi per sequenze HPV raramente si associano a lesioni [64]; la ricerca di sequenze HPV può quindi essere usata per il triage, cioè la selezione dei casi da sottoporre ad ulteriori accertamenti. Per valutare sensibilità, specificità e costo del test HPV nel triage di donne con diagnosi di ASC-US abbiamo condotto uno studio multicentrico che ha coinvolto i servizi di screening di cinque ULSS del Veneto: ULSS 16 (Padova coordinamento), ULSS 7 (Conegliano), ULSS 8 (Castelfranco), ULSS 13 (Dolo), ULSS 18 (Rovigo).

L'utilizzo del test HPV nello screening come test primario è invece l'oggetto dello studio Nuove Tecnologie per lo screening del Carcinoma Cervicale (NTCC). Si tratta di un trial multicentrico randomizzato su 94.175 donne, iniziato nel 2002, che coinvolge nove centri di screening in sei regioni italiane: Torino (Piemonte—centro coordinatore), Padova e Verona (Veneto), Bologna, Imola e Ravenna (Emilia Romagna), Trento (Trentino), Firenze (Toscana), Viterbo (Lazio). Lo studio ha come obiettivo di valutare se, rispetto al Pap test tradizionale, il test per la ricerca dei tipi ad alto rischio dell'HPV (HC2, Digene) permette di migliorare l'efficacia dello screening [65] [66] [67]. È stato condotto anche uno studio di valutazione della prevalenza tipo-specifica in carcinomi invasivi della cervice

uterina in modo da determinare quali tipi sono prevalentemente coinvolti nei casi di carcinomi invasivi in Veneto; è stata inoltre valutata la frequenza di varianti virali di HPV 16 (esistono varianti con maggior aggressività biologica a diversa distribuzione geografica).

Il confronto fra diverse metodiche di amplificazione per la ricerca e la tipizzazione di HPV ha lo scopo di definire la loro sensibilità e specificità per poter formulare strategie diagnostiche efficaci nei diversi ambiti clinici (screening, triage, follow-up). L'utilizzo della tipizzazione è importante per valutare la persistenza dell'infezione, come marcatore di rischio di progressione (specialmente per i tipi 16 e 18), in studi epidemiologici per stabilire la prevalenza dei diversi tipi. La nuova frontiera nella prevenzione del carcinoma della cervice è la vaccinazione profilattica, e la tipizzazione sarà utile nel monitoraggio delle donne vaccinate.

2.1. DISEGNO E OBIETTIVI DELLO STUDIO ASC-US

Le donne con precedente diagnosi ASC-US arruolate nello studio sono state sottoposte a Pap test, colposcopia (con eventuale biopsia), e ricerca sequenze HPV mediante il test HC2 (Hybrid Capture 2 Digene) con sonde per tipi ad alto rischio. In caso di risultati non negativi ad almeno uno dei test era prevista una rivalutazione a sei mesi; le donne con lesioni di alto grado sono state sottoposte a terapia escissionale. Follow-up: controllo a 12 mesi con ripetizione di Pap test, colposcopia, e test HPV secondo il protocollo operativo (Figura 12). I campioni HC2 positivi sono stati analizzati mediante amplificazione con primers consenso per la regione L1 per la definizione dei tipi di HPV presenti.

Gli obiettivi di questo progetto consistono nel:

1. valutare la sensibilità e la specificità del test HPV per l'identificazione di lesioni di alto grado.
2. determinare il/i tipo/i di HPV presente/i per valutare il significato clinico della tipizzazione.

TRIAGE CASI ASC-US - PROTOCOLLO OPERATIVO

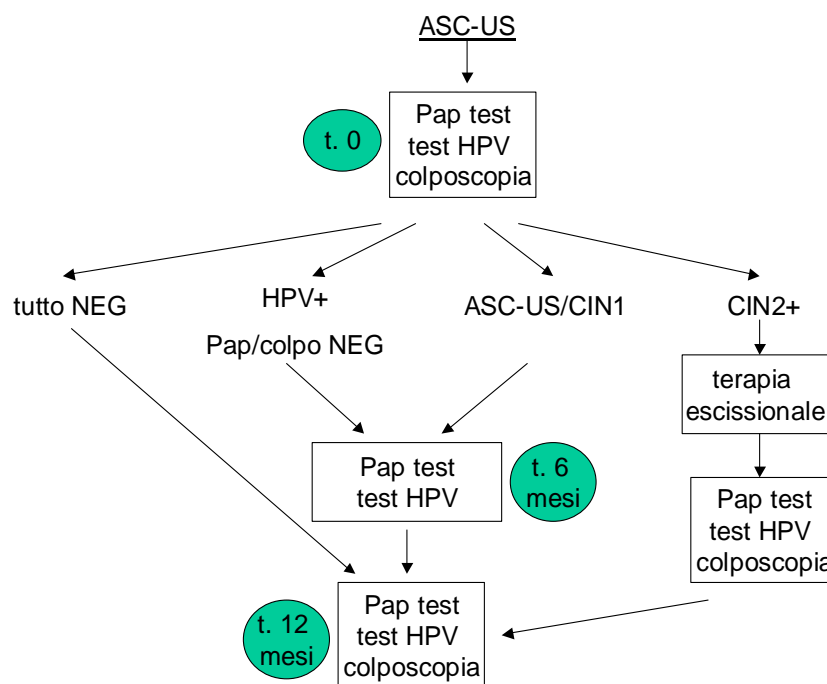


Figura 12 Protocollo operativo studio ASC-US

2.2. DISEGNO E OBIETTIVI DELLO STUDIO NTCC

Lo studio si componeva di due bracci e due fasi; braccio convenzionale: Pap test in entrambe le fasi; braccio sperimentale: citologia in fase liquida e test HC2 in fase 1, e test HC2 in fase 2. L'arruolamento è iniziato nel 2002 e concluso nel 2004; sono state arruolate 94.175 donne di età 25-60 anni.

Per il centro di screening dell'ULSS 16 di Padova hanno partecipato 10.576 donne, 5.284 assegnate al braccio convenzionale e 5.292 al braccio sperimentale.

Gli obiettivi finali del trial sono:

- Valutare, rispetto alla citologia convenzionale ogni 3 anni, la protezione fornita da uno screening basato sulla ricerca molecolare dell'HPV.
- Definire le migliori strategie per l'utilizzo di un test HPV come test primario.

In questa tesi verranno presentati i dati di sensibilità e specificità del test HC2 in rapporto agli altri test, e i risultati della tipizzazione in relazione allo sviluppo di

lesioni di alto grado e all'andamento nel tempo dell'infezione, e i risultati di prevalenza dei tipi di HPV nei carcinomi della cervice.

Verranno discusse le diverse metodiche per la tipizzazione di HPV nei diversi ambiti clinici, nel triage di donne con diagnosi ASC-US, e come test primario nello screening.

MATERIALI E METODI

3.1. POPOLAZIONE E CAMPIONI

TIPIZZAZIONE CARCINOMI CERVICALI

Sono stati analizzati 48 campioni inclusi in paraffina di casi operati negli anni 1997-1999 a Padova e Vicenza, selezionati dal Registro Tumori del Veneto (RTV).

PROGETTO ASC-US

La popolazione coinvolta in questo progetto è rappresentata da donne con un'età di 25-60 anni, con diagnosi di ASC-US allo screening citologico nei 12 mesi precedenti. Prima di aderire allo studio hanno firmato un consenso informato. Nel corso della visita al momento dell'arruolamento sono state sottoposte a Pap test convenzionale, colposcopia con eventuale biopsia mirata e prelievo di cellule esfoliate cervico-vaginali conservate in STM (Standard Transport Medium); i campioni istologici sono stati fissati e inclusi in paraffina.

PROGETTO NTCC

Le donne invitate in questo progetto fanno parte di programmi di screening cervicale e hanno un'età compresa fra 25 e 60 anni. Sono state escluse dallo studio quelle donne con follow-up dopo citologia o istologia positiva, pazienti trattate per cancro cervicale o SIL (Squamous Intraepithelial Lesion) negli ultimi 5 anni, pazienti isterectomizzate, donne in gravidanza e vergini.

Al momento dell'arruolamento è stato fatto un prelievo di cellule esfoliate cervico-vaginali conservate in soluzione Thin Prep (Cytoc) (1^a fase) o in soluzione STM (Standard Transport Medium) (2^a fase). Di questi campioni è stata fatta anche la banca biologica per successive analisi di tipizzazione.

3.2 HYBRID CAPTURE 2 HPV DNA TEST (HC2, DIGENE CORP., USA)

Per la ricerca del DNA del Papillomavirus umano è stato utilizzato il test HC2 con 13 sonde RNA per i tipi ad alto rischio 16, 18, 31, 33, 35, 39,45,51,52, 56, 58, 59, 68.

I campioni cervicali conservati in soluzione Thin Prep (Cytoc) sono stati prima trattati con HC2 Sample Conversion Kit allo scopo di eliminare il fissativo (contenente metanolo).

I campioni cervicali conservati in STM o Thin Prep (Cytoc) dopo conversione contenenti il DNA bersaglio sono stati denaturati e poi ibridizzati con la miscela di sonde RNA. Gli ibridi RNA/DNA risultanti sono stati catturati sulla superficie dei pozzetti di una micropiastra rivestita di anticorpi specifici per tali ibridi. Gli ibridi immobilizzati sono stati fatti reagire con anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina specifici per gli ibridi RNA/DNA, che rilevati poi mediante un substrato chemiluminescente. Ad ogni anticorpo sono coniugate varie molecole di fosfatasi alcalina. Più anticorpi coniugati si legano ad ogni ibrido catturato, dando luogo ad una sostanziale amplificazione del segnale. Poiché il substrato viene scisso dalla fosfatasi alcalina legata, si verifica l'emissione di luce, che viene misurata da un luminometro e quantificata in unità di luce relative (RLU). L'intensità della luce emessa indica la presenza o l'assenza di DNA bersaglio nel campione.

In ogni seduta analitica sono stati inseriti: il calibratore positivo (HPV 16, 1pg/ml), il calibratore negativo (HPV 11, 1pg/ml), il controllo di qualità positivo per tipi ad alto rischio (QC HR, DNA dell'HPV 16 clonato, 5pg/ml) e il controllo di qualità positivo per tipi a basso rischio (QC LR, DNA dell'HPV 6 clonato, 5pg/ml).

Il valore medio RLU dei 3 calibratori positivi determina il valore soglia (cut off): se il rapporto ottenuto tra il valore di chemiluminescenza del campione ed il "cut-off" è inferiore a 1, il campione risulta negativo, mentre un rapporto superiore è considerato positivo. Una misurazione di RLU uguale o superiore al valore di soglia indica la presenza di sequenze di DNA dell'HPV nel campione. Una misurazione di RLU inferiore al valore di soglia indica l'assenza delle sequenze di

DNA dell'HPV o livelli di DNA dell'HPV inferiori al limite di rilevazione del test.

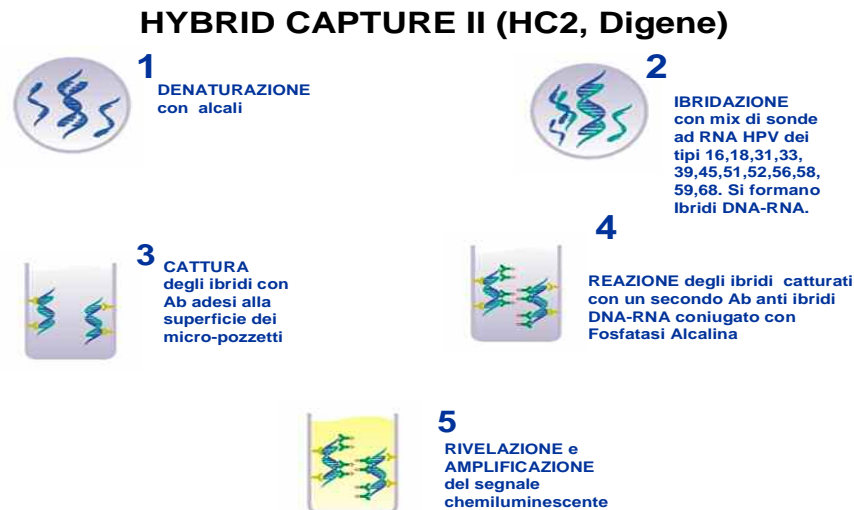


Figura 13: Sequenza di fasi della tecnica Hybrid Capture 2

3.3. ESTRAZIONE DEL DNA

DA SOSPENSIONI CELLULARI

Nello studio ASC-US l'estrazione del DNA, eseguita partendo da campioni in STM, è stata fatta del pellet di cellule cervico-vaginali mediante incubazione con un buffer di lisi (TRIS 1M pH 8.5; EDTA 0.5 M pH 8.0; TWEEN 20) alla presenza di proteinasi K 10 mg/ml (Roche diagnostics, Germany) a 55°C per 1 ora, e successiva inattivazione della proteinasi K per 10' a 95°C. Il DNA così ottenuto è stato valutato in minigel di agarosio allo 0.8%.

Nello studio NTCC l'estrazione del DNA è stata fatta con il kit QIAamp® DNA (QIAGEN) seguendo le indicazioni della ditta produttrice.

DA TESSUTO FISSATO E INCLUSO IN PARAFFINA

L'estrazione del DNA è stata fatta seguendo il protocollo del kit QIAamp® DNA (QIAGEN).

ESTRAZIONE DI DNA CON FENOLO/CLOROFORMIO

Questo tipo di estrazione è stata applicata a quei campioni lisati risultati negativi alla reazione di amplificazione con i primer per il gene housekeeping β -globina. Per purificare il DNA è stato aggiunto 1 volume di PC9 (miscela fenolo-cloroformio) seguito da una centrifugazione. La fase superiore ottenuta è stata trasferita in un'altra provetta ed è stato aggiunto 1 volume di cloroformio (Sigma), che serve per eliminare i residui di fenolo. Questo passaggio porta alla separazione della fase organica (contenente le proteine) dalla fase acquosa (contenente gli acidi nucleici). È stata prelevata la parte acquosa e il DNA è stato fatto precipitare con etanolo 99% freddo. Successivamente, sono stati eseguiti dei lavaggi con etanolo 70% per rimuovere eventuali residui. Il DNA ottenuto è stato valutato in minigel di agarosio allo 0.8%.

3.4 AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR

PCR per gene β -globina per valutare l'integrità del DNA. Amplificazione mediante l'utilizzo dei primers PC04 e GH20 che amplificano un frammento di 268 bp; la reazione conteneva un mix (1X Buffer PCR, 200 μ M di dNTPs, 1.5 mM di MgCl₂, 23 pmol di ogni primer, 2 U di AmpliTaq polimerasi) e 100 ng-200 ng di DNA in un volume finale di 25 μ l.

PCR per sequenze HPV. La presenza di sequenze HPV è stata valutata utilizzando diversi primers consenso che riconoscono sequenze conservate della regione L1 del genoma HPV (Figura 14).

- *MY09/MY11* amplificano un frammento di 450 bp; la mix di amplificazione è composta da: 1X PCR buffer, 200 μ M di dNTPs, 3.5 mM di MgCl₂, 50 pmol di ogni primer e 2.5 U di AmpliTaq Gold polimerase e 100 ng-200 ng di DNA in un volume finale di 50 μ l;
- *GP5+/GP6+* generano un amplificato di 150 bp; la mix di amplificazione è composta da: 1X PCR buffer, 200 μ M di dNTPs, 1.5 mM di MgCl₂, 50 pmol di ogni primer e 0.5 U AB super Taq (AB Analitica) e 100 ng-200 ng di DNA in un volume finale di 25 μ l; nello studio NTCC la reazione di amplificazione con primers GP5+/6+ è stata eseguita con una master mix fornita come kit prototipo della ditta DIGENE.

- *SPF₁₀* generano un amplificato di 65 bp; il kit commerciale INNOLIPA (INNOGENETICS) fornisce una mix di amplificazione (tampone, dNTPs, MgCl₂, primers) e una mix di enzimi (TaqGold polimerasi e Uracil-N-glicosilasi (UNG)); quest'ultima serve per prevenire la contaminazione da "carry-over" di DNA da precedenti reazioni di PCR. Il volume finale è di 50 µl (40 µl di master mix e 10 µl di DNA).

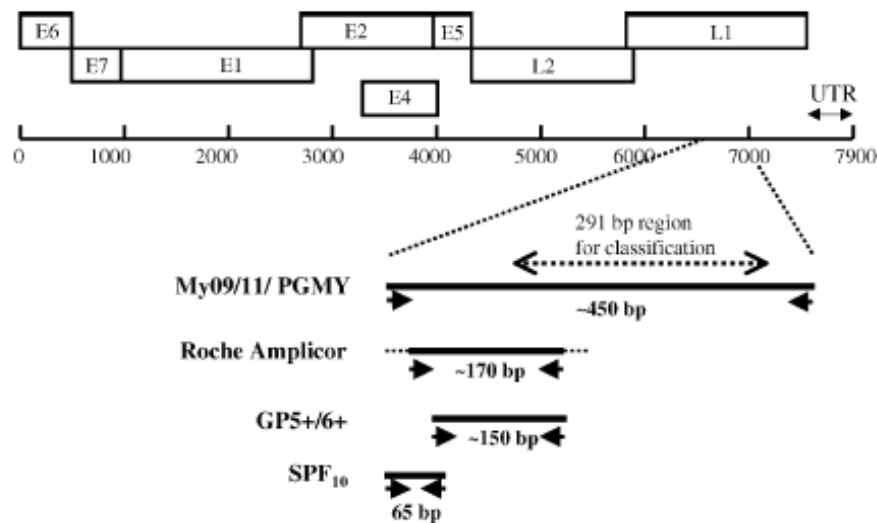


Figura 14: Localizzazione dei primers nella regione L1 HPV (Moljin, 2005)

Sono stati utilizzati anche i primers tipo-specifici per la regione E6 di HPV 16 H16L1 e H16R3 che danno origine ad un amplificato di 323 bp; il mix consiste di un volume finale di 25 µl e viene preparato con queste concentrazioni: 1X Buffer PCR, 200 µM di dNTPs, 2.0 mM di MgCl₂, 25 pmol di ogni primers, 2.0 U di AmpliTaq e 100 ng – 200 ng di DNA. In casi selezionati è stata eseguita anche l'amplificazione della regione E7 di HPV 18 con i primers tipo-specifici HPV18 sense e HPV18 antisense che danno origine ad un amplificato di 98 bp; il mix consiste di un volume finale di 25 µl e viene preparato con queste concentrazioni: 1X Buffer PCR, 200 µM di dNTPs, 1.5 mM di MgCl₂, 25 pmol di ogni primers, 1.0 U di AmpliTaq e 100 ng – 200 ng di DNA.

In ogni PCR vengono inseriti un controllo negativo (acqua sterile) ed un controllo positivo (DNA delle linee cellulari SiHa o HeLa che contengono rispettivamente HPV 16 e HPV 18). I risultati della reazione di amplificazione si controllano utilizzando un gel di agarosio al 2%.

3.5. ANALISI DEI PRODOTTI AMPLIFICATI PER LA TIPIZZAZIONE

Gli amplificati ottenuti con le 3 coppie di primers consenso sono stati analizzati ulteriormente per l'identificazione dei genotipi di HPV. Per gli amplificati MY09/11 è stata utilizzata la metodica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) che permette di identificare 49 tipi di HPV [68]. Per gli amplificati GP5+/6+ è stato fatto il sequenziamento o l'ibridazione inversa con il kit Line Blot consensus High Risk HPV Genotyping Digene; (identifica i tipi: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82). Per SPF₁₀ è stata effettuata l'ibridazione su striscia con il kit INNOLipa (INNOGenetics) che contiene 25 sonde specifiche per i seguenti genotipi di HPV: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82.

RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM). Per l'analisi di restrizione dei frammenti amplificati con i primers MY09/MY11 sono stati utilizzati quattro enzimi di restrizione: RsaI, HaeIII, DdeI, PstI e i frammenti digeriti sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica in gel di acrilamide/bis-acrilamide 19:1. I pattern di bande di restrizione che si generano sono genotipo-specifico [68].

Ibridazione del prodotto amplificato su striscia (Line Blot e INNOLipa) [53] [69]. Il principio della metodica si basa sull'ibridazione inversa dell'amplificato con sonde HPV-specifiche adese a strisce di nitrocellulosa. La marcatura dell'amplificato è fatta utilizzando nucleotidi biotinilati durante lo step di amplificazione. Tali nucleotidi possono essere aggiunti alla miscela di reazione o contenuti nei primers.

L'ibridazione è fatta seguendo alcuni passaggi principali:

- ❖ Denaturazione: mediante un'incubazione a 95°C l'amplificato marcato viene denaturato.
- ❖ Ibridazione: durante la quale l'amplificato marcato e la membrana vengono incubati con un buffer specifico seguendo condizioni di temperatura e agitazione rigorose.

- ❖ Lavaggi: per rimuovere l'eccesso di amplificato marcato si lava con una soluzione stringente.
- ❖ Rivelazione colorimetrica dell'ibrido formato, in base al tipo di sonda marcata utilizzata.
- ❖ Interpretazione dei risultati

Tutti i kit sono forniti dei controlli positivi di amplificazione e ibridazione e un controllo interno di colorazione.

SEQUENZIAMENTO

I campioni positivi con primers GP5+/6+ sono stati sottoposti a sequenziamento diretto.

Il protocollo di reazione prevede due principali momenti: una prima incubazione (37°C per 15 minuti e 80°C per 15 minuti) in cui 15 µl di amplificato sono stati fatti reagire con 2 µl di ExoSAP-IT (USB Corporation), un reagente contenente esonucleasi I e fosfatasi alcalina che permette di rimuovere i primers e i dNTPs in eccesso, agendo specificatamente su molecole a singolo filamento. La seconda fase è una reazione di cycle-PCR con BigDye terminator (mix costituita di ddNTPs coniugati con quattro fluorocromi diversi) e il primer reverse specifico (3.2 pmoli). Il prodotto di reazione è stato purificato tramite l'impiego di colonnine AutoSeq G-50 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inghilterra), che permettono la rimozione delle molecole residue. Il purificato è stato denaturato con il reagente TSR (template sample reagent, contenente formammide).

Il prodotto denaturato è stato analizzato con il sequenziatore automatico ABI Prism 310 (Applied BioSystem) che separa i prodotti di reazione tramite elettroforesi capillare e ne consente la rivelazione mediante analisi di fluorescenza. I diversi frammenti di amplificato vengono separati tra loro e i fluorocromi dei ddNTPs incorporati in ciascun frammento vengono eccitati da laser del sequenziatore con emissione di luminescenza a lunghezze d'onda specifiche per ciascun ddNTP. I dati vengono elaborati e rappresentati tramite un elettroferogramma costituito da picchi colorati, ognuno dei quali corrisponde ad un nucleotide.

La sequenza fornita dallo strumento viene confrontata con le sequenze HPV note e contenute nelle banche dati utilizzando il programma BLAST N (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) che permette di identificare il tipo di HPV presente.

I campioni positivi per HPV 16 con primers tipo-specifici della regione E6 sono stati sottoposti ad analisi di sequenza per la ricerca di mutazioni per la caratterizzazione dell'isolato virale. Per la caratterizzazione dell'isolato virale dei campioni contenenti HPV 16 è stato fatto un confronto tra la sequenza prototipo e quella ottenuta dalla sequenza del campione.

3.6. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI mRNA E6/E7

L'espressione dei trascritti E6/E7 è stata valutata su alcuni dei campioni positivi per HPV 16, 18, 31, 33 e 45.

Inizialmente è stato estratto l'RNA da cellule cervicovaginali utilizzando il kit RNeasy Mini (Qiagen, Amburgo, Germania). Il protocollo consiste nel lisare le cellule con un tampone di lisi, seguito da una precipitazione con etanolo al 70% v/v. La sospensione viene trasferita in colonnine contenenti membrane di silice capaci di legare selettivamente l'RNA. Vengono eseguiti due lavaggi con tamponi forniti dal kit. Infine, l'RNA viene eluito con acqua priva di RNAsi.

La valutazione dell'espressione di mRNA E6/E7 è stata fatta utilizzando il kit Pre-Tect HPV Proofer (Norchip, Alfawassermann). È un test qualitativo di amplificazione di RNA che utilizza gli enzimi Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (AMV-RT), RNasi H di Escherichia coli, T7 RNA polimerasi. Ad ognuno dei seguenti mix ISC/HPV 16, HPV 18/31 e HPV 33/45 sono stati aggiunti gli enzimi, i primers, le sonde molecular beacon caratteristiche per ogni mix e acqua. Ad ogni pozzetto della piastra sono stati aggiunti la mix specifica e l'RNA estratto dai campioni, o un controllo positivo o negativo, secondo il seguente schema:

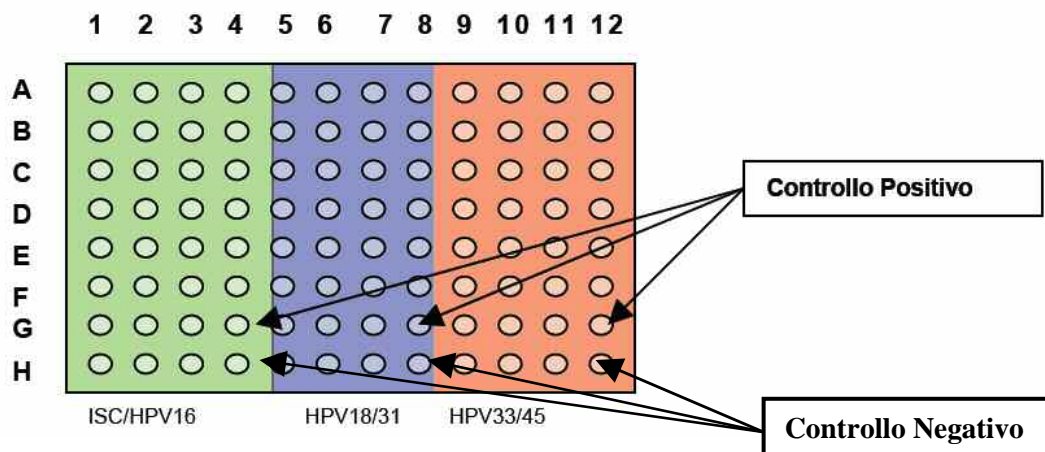


Figura 15. Schema della piastra Pre-Tect HPV Proofer

La piastra è stata denaturata e poi messa nel lettore fluorescente per l'amplificazione. Durante la fase di amplificazione (Figura 16) avviene l'ibridazione del primer P1 (che contiene un promotore riconosciuto dall'enzima T7) con l'RNA target. L'enzima AMV-RT allunga il primer P1 creando una copia a cDNA dell'RNA stampo, formando un ibrido RNA/DNA. L'RNasi H riconosce l'ibrido RNA/DNA, degrada l'RNA lasciando un filamento singolo di DNA dove si lega il secondo primer (P2). Interviene un'altra volta l'enzima AMV-RT che allunga il primer P2 costruendo il doppio filamento di DNA. La T7 RNA Polimerasi, che riconosce il promotore presente nel primer, produce copie multiple dell'RNA trascritto rappresentanti la sequenza anti-senso dell'RNA target originale. L'RNA amplificato è rilevato in Real time attraverso l'uso delle sonde molecular beacons. Le molecular beacons sono delle sonde a stem-loop che contengono da un lato il quencher non fluorescente e dall'altro il fluoroforo. Quando si trova in questa conformazione non emette fluorescenza poiché l'energia viene trasferita al quencher. Quando trova il target cambia conformazione portando ad una separazione fisica del quencher dal fluoroforo con l'emissione di fotoni della lunghezza d'onda specifica per il fluoroforo.

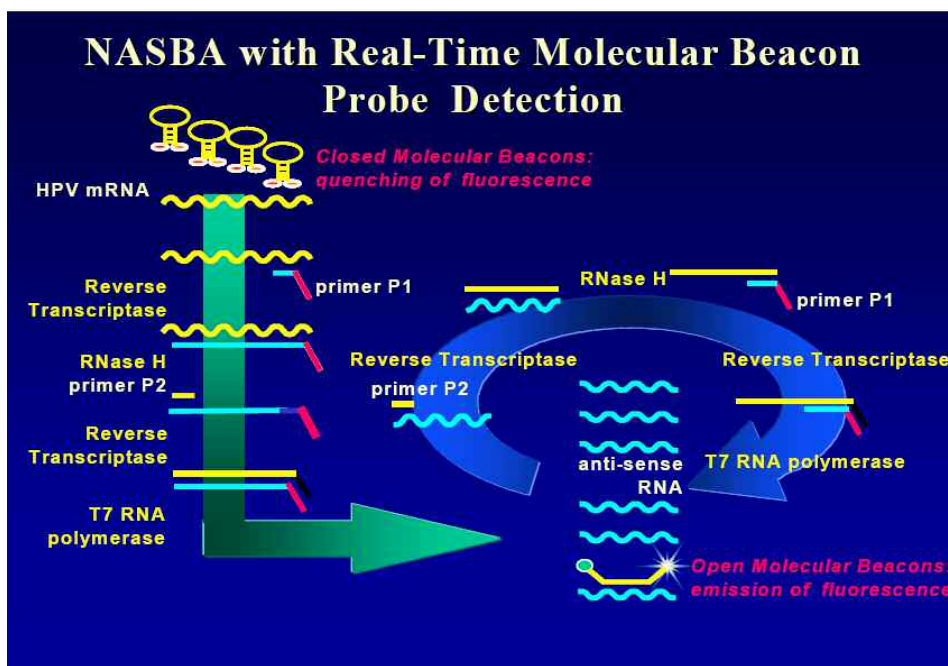


Figura 16. Principio di amplificazione NASBA

Il fluoroforo utilizzato per ISC, HPV 18 e HPV 45 è il Texas Red mentre per HPV 16 e HPV 33 si usa FAM; questi fluorofori emettono fluorescenza in diverse lunghezze d'onda. Questo permette di rilevare i due genotipi di HPV nello stesso pozzetto. Si ottengono delle curve esponenziali dove l'intensità di fluorescenza è proporzionale alla concentrazione dell'amplicone.

3.7. ANALISI STATISTICA

L'analisi per la sensibilità e specificità tra i test, la correlazioni tra tipi e lesioni e l'associazione tra le variabili indipendenti e la clearance è stata valutata attraverso una regressione multipla utilizzando il software statistico STATA 7.0 con una soglia di significatività $p < 0.05$.

RISULTATI

4.1. TIPIZZAZIONE CARCINOMI CERVICALI

In questo progetto sono stati analizzati 48 campioni inclusi in paraffina di casi operati negli anni 1997-1999 a Padova e Vicenza, selezionati dal Registro Tumori del Veneto (RTV). Lo studio è stato effettuato nel 2006 e i risultati sono stati raccolti in un articolo pubblicato su *Infectious Agents and Cancer* [70].

In 43 casi la diagnosi istologica era carcinoma squamoso della cervice, e in 5 casi adenocarcinoma. L'età media era di 55 anni (28-89).

Dei 48 casi totali, 3 campioni sono risultati non amplificabili per il gene housekeeping β -globina e sono stati esclusi (definiti come non adeguati).

Dei 45 campioni adeguati, 1 è risultato negativo con tutti i test per HPV, mentre 44 (97.8%) sono risultati HPV positivi. Sono state identificate 39 infezioni singole (86.6%) e 5 infezioni multiple (11.4%) (Tabella 6).

Tabella 6. Tipo HPV e distribuzione in relazione all'istologia

Tipo HPV	Carcinoma Squamoso della cervice	Adenocarcinoma
Infezione singola		
HPV16	26	2
HPV 18		1
HPV 33	2	2
HPV 35	1	
HPV 45	2	
HPV 52	1	
HPV 58	2	
Infezione multipla		
HPV 16 + HPV18	3	
HPV 16 + HPV 31	1	
HPV 56 + HPV 70	1	

Il tipo più frequente è risultato HPV 16 (72.5%), seguito dai tipi 33, 45 e 18, come si può vedere nella Figura 17.

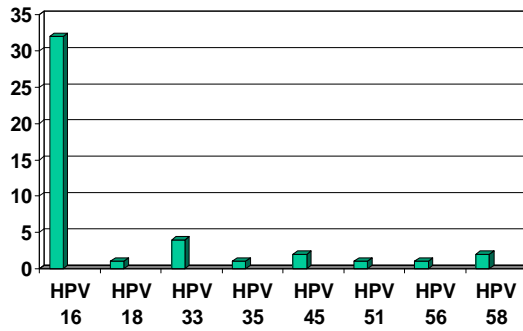


Figura 17. Prevalenza dei tipi di HPV nei carcinomi della cervice uterina

In 25/32 carcinomi cervicali HPV 16 positivi è stata effettuata l'analisi di sequenza della regione E6: in 7 casi è stato identificato il prototipo (18%), e in 18/25 (72%) le sequenze corrispondevano a varianti virali; in 14 casi era presente la mutazione T350G (variante L83V) (Figura 18) isolata, in 3 casi la mutazione T350G (variante L83V) era associata ad un'altra mutazione (T256C, A257G, A442C), mentre 1 caso presentava le mutazioni T350G, T286A, A289G, C335T

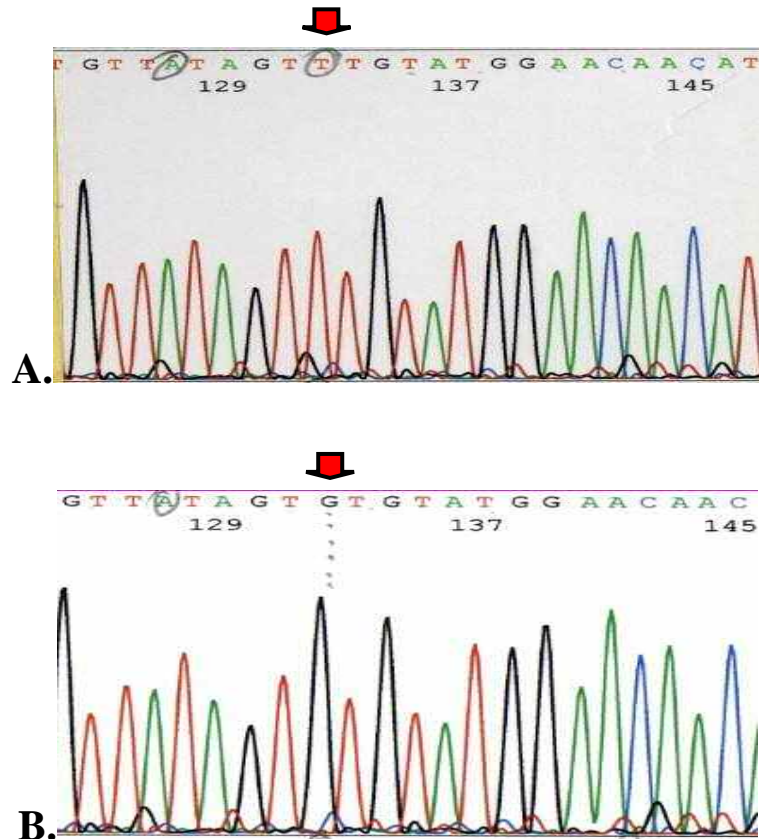


Figura 18. Sequenza del prototipo (A) e della variante virale T350G (L83V) (B) di HPV 16; le frecce indicano il nucleotide in posizione 350 (gene E6).

4.2. STUDIO ASC-US

L'arruolamento è cominciato a marzo 2005 e finito a luglio 2006 ed è stato effettuato in 5 centri screening del Veneto. Sono state arruolate 749 donne di età compresa tra 25 e 65 anni (media 42 anni). Per la maggior parte delle donne l'arruolamento è avvenuto in un periodo tra 3-6 mesi dal momento della diagnosi originale di ASC-US (media 72.25 giorni). La distribuzione per età delle donne arruolate è rappresentata in Figura 19.

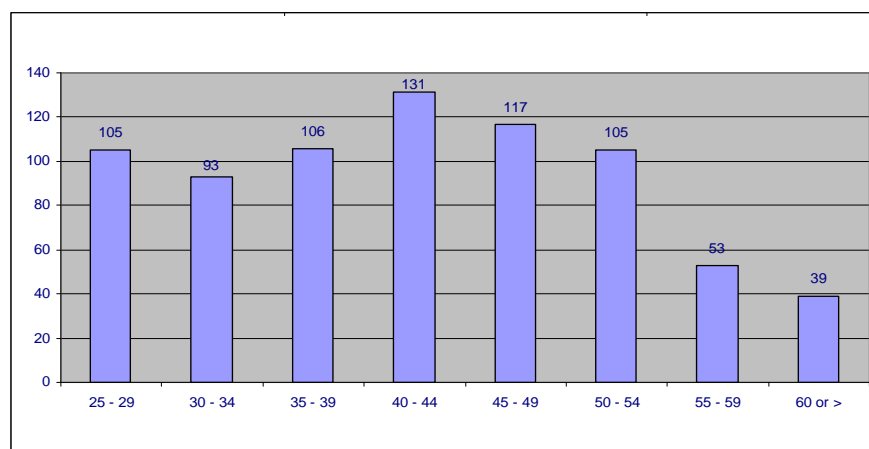


Figura 19. Numero di donne arruolate per fascia di età (anni)

4.2.1. ESITI DEL TEST ALL'ARRUOLAMENTO

4.2.1.1. TEST HC2

Tutte le donne arruolate hanno eseguito il test HC2 con sonde per tipi ad alto rischio, che è risultato negativo in 568 casi e positivo in 181 casi. La prevalenza di HPV osservata è cumulativamente pari al 24%, con differenze tra i vari centri (20%, 27%, 40%, 19%, 23%, rispettivamente), e differenze per età: più alta nella fascia 25-35 anni con un calo della prevalenza con l'aumentare dell'età e la presenza di un secondo picco (poco pronunciato) nella fascia di età 55-60 anni (Figura 20). Il risultato del test HC2 è stato espresso come rapporto RLU/PC (unità di luce relativa/calibratore positivo); nei 181 campioni positivi (con un rapporto >1) è risultato fra 1 e 2 in 9 campioni, fra 2 e 10 in 30 campioni, e >10 in 142 campioni.

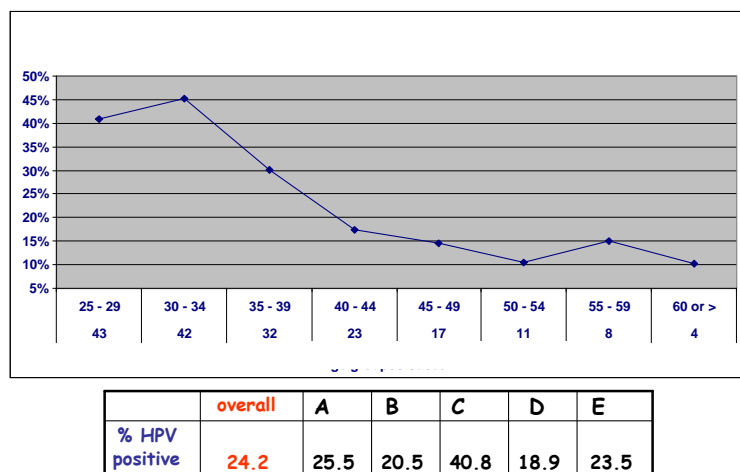


Figura 20. Donne HPV positive per fasce di età

4.2.1.2. RISULTATI DEL PAP TEST

L'esame citologico (Pap test convenzionale) è stato effettuato al momento dell'arruolamento in 717 casi. Ha evidenziato un quadro entro limiti di norma in 490 casi (68.3%), presenza di cellule di incerto significato (ASC-US) in 99 (13.8%), cellule atipiche probabilmente di alto grado (ASC-H) in 10, cellule ghiandolari atipiche (AGC) in 2, lesioni di basso grado (LSIL) in 90, lesioni di alto grado (HSIL) in 10, mentre 16 campioni sono risultati inadeguati.

4.2.1.3 RISULTATI DELLA COLPOSCOPIA

La colposcopia è stata fatta in 742 donne; in 488 il quadro colposcopico è risultato normale, mentre in 254 donne sono state evidenziate anomalie: 237 con grading 1 (G1) e 17 con grading 2 (G2).

I risultati cumulativi, confrontando le tre metodiche (Pap test, Colposcopia, HC2 test), possono essere così riassunti: in 399 casi sono risultati tutti negativi, in 65 casi il test HC2 era positivo e la colposcopia e il Pap test negativi, in 285 il test HC2 era negativo con Pap test e/o colposcopia positivi. In 388 casi è stata effettuata una biopsia mirata nel corso della colposcopia: in 20 casi è stata diagnosticata una lesione di alto grado (CIN2+). Nel corso del follow-up sono poi state identificate altre 9 lesioni di alto grado. Il test HC2 all'arruolamento nelle donne con lesioni CIN2+ è risultato positivo in 27 e negativo in 2. Quindi una

lesione di alto grado si è sviluppata in 27/181 (14.9%) donne con test HC2 positivo all'arruolamento e in 2/568 (0.35%) donne con test HC2 negativo all'arruolamento. Sono state valutate la sensibilità, la specificità ed il valore predittivo positivo (VPP) di ogni test. I dati sono riportati nella tabella sottostante:

Tabella 7. Sensibilità, specificità e VPP dei test.

	Sensibilità % (95% CI)	Specificità % (95% CI)	VPP % (95% CI)
Pap test	74.1 (70.9-77.3)	72.3 (69.0-75.6)	9.5 (7.3-11.6)
❖ <35 anni	66.7	65.54	9.48
❖ >35 anni	83.3	74.7	7.14
Colposcopy	79.3 (76.4-82.2)	67.6 (64.2-71.0)	9.1 (7.0 -11.1)
❖ <35 anni	81.2	54.4	
❖ >35 anni	76.9	72.1	
HPV test (HC2)	93.1 (91.3-94.9)	78.6 (75.7-81.5)	14.9 (12.4-17.5)
❖ <35 anni	87.5	60.4	
❖ >35 anni	100	84.8	
HPV test + Pap	100 (100-100)	62.5 (58.9-66.0)	9.4 (7.3-11.6)
❖ <35 anni	100	50.3	
❖ >35 anni	100	66.7	

Il test HC2 risulta essere più sensibile e più specifico, con VPP più alto rispetto al Pap test e alla colposcopia. L'analisi per fasce di età dimostra valori più alti soprattutto per le donne di età superiore ai 35 anni. L'aggiunta del Pap test al test HC2 aumenta la sensibilità ma riduce di molto la specificità.

4.2.2. TIPIZZAZIONE CAMPIONI POSITIVI AL TEST HPV (HC2+)

Le analisi per la definizione del/i tipo/i presente/i sono state effettuate secondo l'algoritmo delineato in Figura 21 su tutti i campioni HC2+ all'arruolamento e/o al follow-up e sulle due lesioni di alto grado con test HC2 negativo sul campione citologico di riferimento.

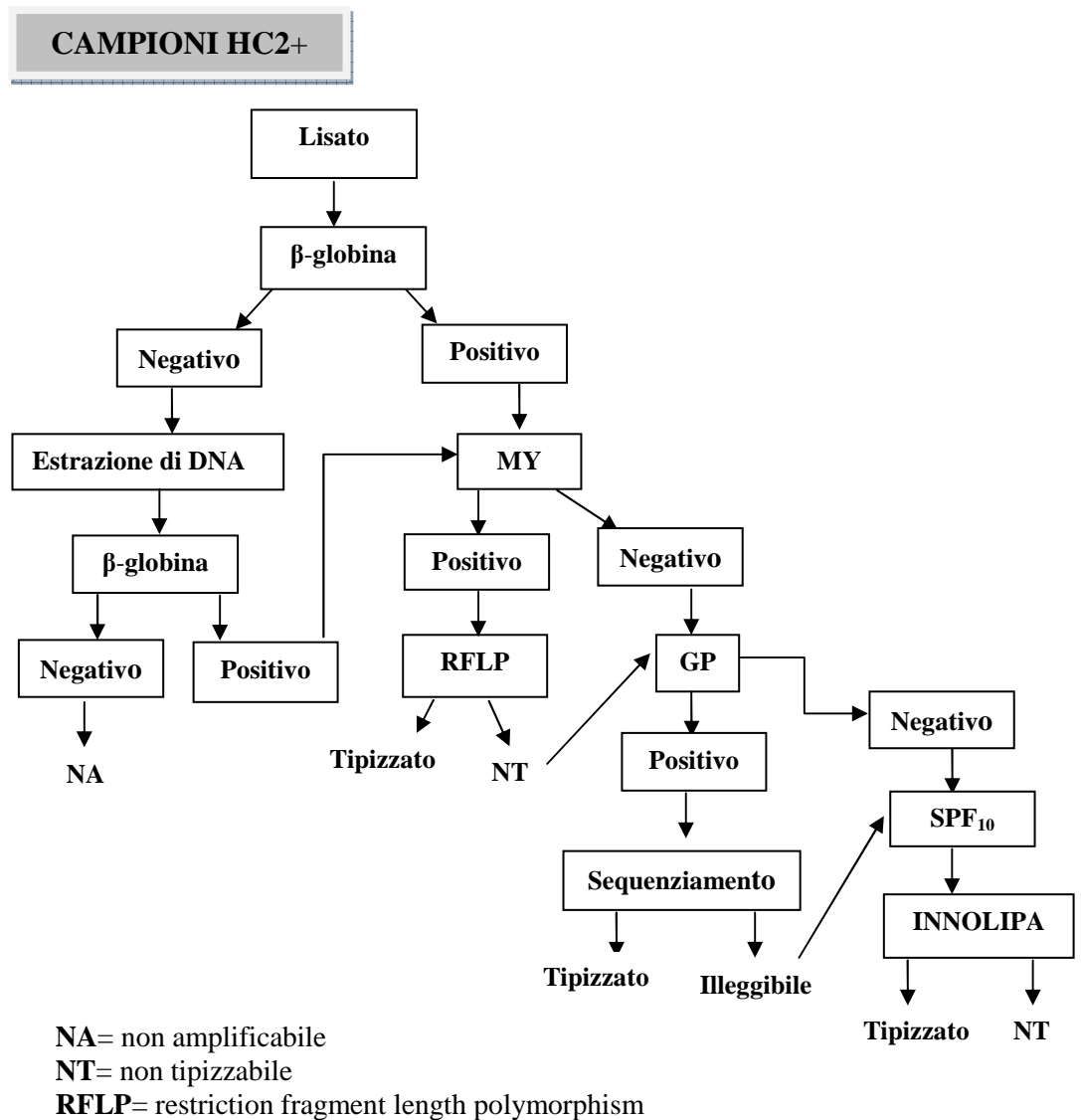


Figura 21 . Algoritmo per la tipizzazione dei campioni HC2+ dello studio ASC-US

Dei 181 casi risultati positivi al test HC2 all'arruolamento, 4 sono risultati non amplificabili (NA). L'amplificazione con i primer MY09/11 è stata eseguita sui rimanenti 177 casi, 138 dei quali sono risultati positivi e 39 negativi. I campioni positivi sono stati tipizzati con gli enzimi di restrizione Rsa I, Hae III, DdeI (e PstI quando necessario) (Figura 22).

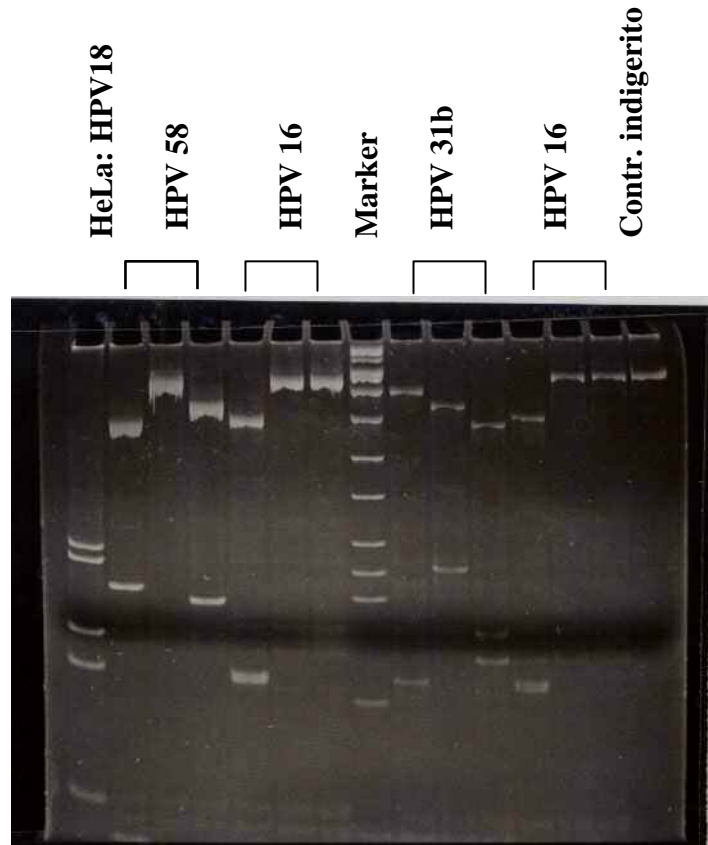


Figura 22. Digestione di amplificati MY con gli enzimi RsaI, HaeIII, DdeI (analisi RFLP).

Sui 39 campioni negativi alla PCR MY09/11 è stata effettuata un'amplificazione con i primers GP5+/6+: 20 sono risultati positivi e 19 sono rimasti negativi. I campioni positivi sono stati tipizzati con il sequenziamento diretto (Figura 23); in un caso non è stato possibile definire il tipo perché la sequenza è risultata illeggibile.

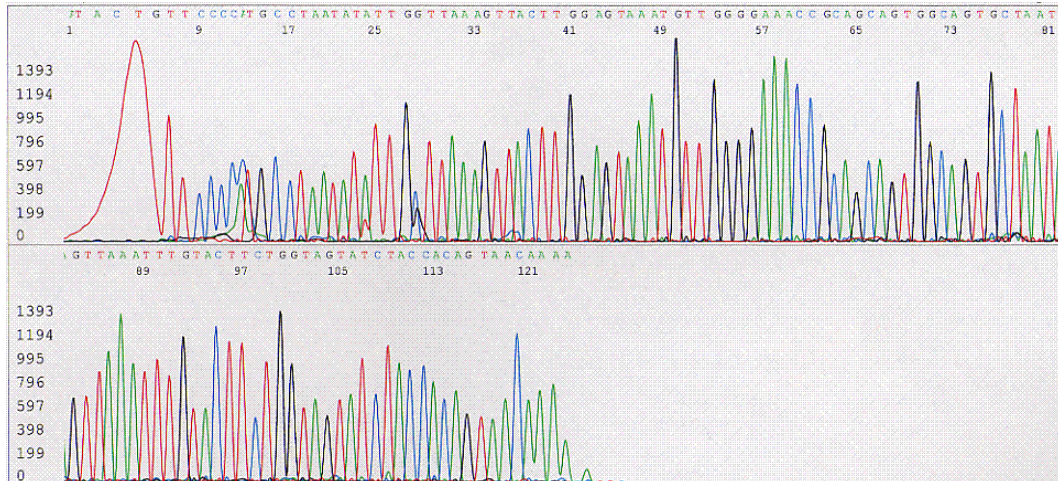


Figura 23. Elettroferogramma di un campione risultato HPV 51 all'analisi BLAST

I 19 campioni negativi e il campione non tipizzato sono stati analizzati con i primers SPF₁₀ utilizzando il kit commerciale INNO-LiPA Genotyping Extra Amp (Innogenetics); 5 sono stati tipizzati, 13 sono rimasti negativi, e 1 non tipizzabile (Figura 24).

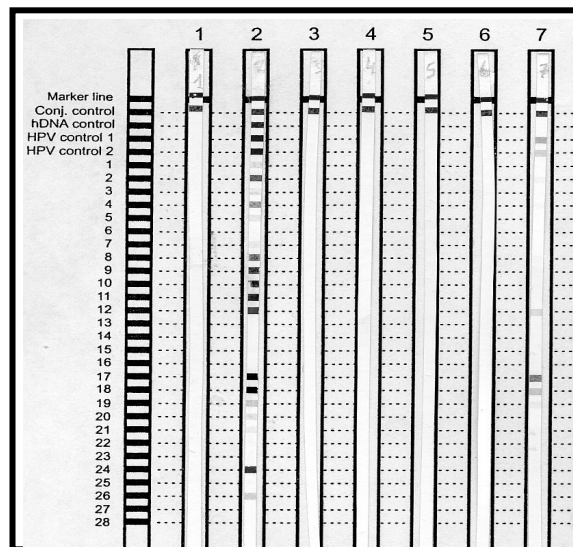


Figura 24. Risultati INNO-LIPA; la striscia 2 mostra un'infezione multipla con HPV 33, 35, 51, la striscia 7 un'infezione multipla con HPV 51, 52.

I genotipi identificati nei 163 campioni HC2 positivi all'arruolamento tipizzabili sono riassunti nella tabella sottostante:

Tabella 8. Prevalenza per tipo HPV nello studio ASC-US

TIPO HPV	N° casi totali	N° casi infez. singola	N° casi infez. mista	%
6	3	2	1	1.84
16	45	34	11	27.61
18	13	8	5	7.98
30	1	1	0	0.61
31	21	14	7	12.88
33	3	0	3	1.84
35	4	2	2	2.45
39	4	2	2	2.45
45	3	3	0	1.84
51	5	5	0	3.07
52	9	8	1	5.52
53	11	11	0	6.75
56	6	6	0	3.68
58	9	7	2	5.52
59	1	1	0	0.61
61	2	2	0	1.23
66	6	6	0	3.68
68	3	3	0	1.84
69	1	1	0	0.61
70	3	2	1	1.84
82	3	3	0	1.84
84	1	0	1	0.61
X*	6	6	0	3.68
Totale	163	127	36	100

* HPV X: tipo nuovo o non ancora identificato

I tipi di HPV riscontrati con maggior frequenza sono HPV 16, HPV 31 e HPV 18. Il quarto in ordine di frequenza è HPV 53, che è un tipo non compreso nel mix di sonde utilizzato nel test HC2. Altri tipi identificati la cui sonda non è contenuta nel mix HC2 sono: 6 casi di HPV 66 e 3 casi di HPV 6, per un totale di 20 casi (11.3% dei casi HC2+ e amplificabili) che hanno dato un risultato positivo al test HC2 dovuto a cross-ibridazione.

L'analisi del genotipo nelle donne che hanno sviluppato lesioni CIN2+ è stata condotta oltre che nelle cellule cervico-vaginali anche in alcuni dei campioni biotipici. In particolare, per i due casi diagnosticati all'arruolamento ma con test HC2 negativo, la PCR è stata eseguita sulle biopsie diagnostiche utilizzando i

primers GP5+/6+ con successiva analisi di sequenza: sono stati identificati HPV 6 e HPV 51, rispettivamente. Nei casi in cui la lesione CIN2+ è stata diagnosticata durante il follow-up, il test HC2 era positivo sia all'arruolamento che ai controlli precedenti la diagnosi, e in tutti i casi è stata dimostrata infezione persistente con lo stesso tipo. La Tabella 9 riporta i risultati di tutti i 29 casi con lesioni di alto grado.

Tabella 9. Tipizzazione lesioni CIN2+

Genotipo	Infezione singola	Infezione mista	Totali
HPV 16	12	3	15
HPV 31	3	-	3
HPV 52	3	-	3
HPV 18	1	1	2
HPV 35	-	1	1
HPV 51	2	-	2
HPV 58	1	-	1
HPV 6	1	-	1
Negativo			1

Il tipo di HPV più frequentemente identificato è HPV 16 che risulta presente nel 57.7% dei casi, una prevalenza più alta rispetto a quella delle donne che non hanno sviluppato lesioni di alto grado (Tabella 10).

Sui campioni HPV 16 positivi sono state eseguite ulteriori analisi. In particolare, l'analisi di sequenza della regione E6 è stata effettuata in 40 campioni: la variante L83V è stata identificata nel 71.5% delle donne con lesioni CIN2+ e nel 50% delle donne senza lesioni di alto grado. Nella Tabella 10 sono riportate la frequenza del tipo 16 e della variante L83V nelle donne con e senza lesioni di alto grado: entrambe risultano più elevate nei casi CIN2+.

Tabella 10. Casi con infezione da HPV 16

	Donne con lesioni CIN2+ HC2+: n. 27*	Donne senza lesioni di alto grado HC2+: n. 155
HPV 16 prevalenza		
- n. casi tipizzati	26	137
- n. casi positivi	15 (57.7%)	30 (21.9%)
HPV 16 varianti (E6)		
- n. casi testati	14	26
- prototipo	4 (28.5%)	13 (50%)
- variante (L83V)	10 (71.5%)	13 (50%)

*1 caso HC2+ è risultato PCR HPV negativo

4.2.3. RISULTATI DEL FOLLOW-UP

Delle 749 donne arruolate nello studio, 105 (14%) non hanno eseguito nessuna visita di controllo. Delle 644 (86%) donne che hanno eseguito almeno un controllo di follow-up, 113 (14% delle 644) hanno eseguito il Pap test ma non il test HPV; poiché questo si è verificato soprattutto in uno dei cinque centri screening partecipanti, le donne di quel centro sono state escluse dall'analisi sulla clearance/persistenza dell'infezione, che è stata quindi valutata su 103 delle 181 donne HC2 positive all'arruolamento. Cumulativamente, il 49.5% delle donne è risultata negativa al test HC2 ad un tempo medio di follow-up di 12 mesi. Come riassunto nella Tabella 11, la clearance è stata valutata in analisi univariata in relazione a diverse variabili.

Tabella 11. Frequenze e probabilità di clearance, cioè di risultato negativo al test HC2 (in forma OR, odds ratio), all'analisi univariata (CI = intervallo di confidenza).

Variabile	Numero	Clearance (%)	OR	95% CI	p-value
Tutti (n=103)	103	49.5	-	-	-
Età (anni)					
25-34*	44	52.3	1.00		
35-64	59	47.5	0.82	0.37-1.81	0.63
Pap test					
Negativo*	43	51.2	1.00		
ASC-US+	55	49.1	0.92	0.41-2.05	0.84
Colposcopia					
Negativa*	50	46.0	1.00		
Positiva (G1-G2)	51	52.9	1.32	0.60-2.90	0.49
Infezione multipla					
No*	81	55.6	1.00		
Si	22	27.3	0.30	0.10-0.87	0.02
Intervallo di tempo					
≤ 6 mesi	15	6.7	0.07	0.008-0.56	0.012
7-9 mesi*	55	50.9	1.00		
10+ mesi	33	66.7	1.93	0.79-4.73	0.15

*categoria di riferimento

All'analisi univariata che indaga l'associazione tra ciascuna variabile e l'esito (la clearance), soltanto l'infezione multipla e l'intervallo di tempo mostrano un'associazione significativa con la clearance.

Per le due variabili con associazione significativa all'analisi univariata, è stata fatta anche l'analisi multivariata (Tabella 12).

Tabella 12. Analisi multivariata.

Variabile	OR	95% CI	p-value
Infezione multipla			
No*	1.00		
Si	0.33	0.11-1.00	0.049
Intervallo di tempo			
≤ 6 mesi	0.07	0.008-0.59	0.014
7-9 mesi*	1.00		
10+ mesi	1.84	0.74-4.60	0.19

*categoria di riferimento

Rispetto all'analisi univariata non ci sono particolari differenze. Nel modello finale si osserva un'associazione significativa tra infezione multipla e clearance, con una probabilità di clearance ridotta ad un terzo se l'infezione è multipla rispetto alla singola; inoltre, la probabilità di clearance aumenta in modo significativo, di più del 90%, se si attendono più di 6 mesi dalla prima rilevazione. Non ci sono invece differenze significative oltre i 9 mesi. Va peraltro sottolineato che la numerosità della casistica non garantisce che quest'ultimo dato sia dovuto ad un'insufficiente potenza statistica del campione piuttosto che ad una reale mancanza di associazione.

Abbiamo fissato intervalli a 3, 5, 6, 7, 8 mesi dall'arruolamento, per andare a vedere quando comincia la clearance; dall'analisi statistica si osserva che la clearance a 6 mesi è del 8.3%, e a 7 mesi è del 45.5%, e quindi la risoluzione comincia dal settimo mese, indicando che un'infezione dura almeno 6 mesi. Abbiamo poi fatto l'analisi della clearance in relazione al tipo di HPV (Tabella 13) analizzando separatamente 16 e 18, gli altri tipi ad alto rischio più frequenti, e raggruppando i tipi meno frequenti insieme a quelli a basso rischio.

Tabella 13. Frequenza e % di clearance per tipo virale

Tipo virale	Numero	Clearance (%)
HPV 16 + HPV 18	32	59.4
HPV ad alto rischio, 16 e 18 esclusi	32	65.6
HPV probabile alto rischio	16	75
Altri tipi (basso rischio e rari)	31	67.7

I risultati mostrano che HPV 16 e HPV 18 hanno una minore clearance rispetto sia agli altri tipi ad alto rischio che ai tipi a basso rischio e rari che a quelli a probabile alto rischio.

All'arruolamento 568 donne sono risultate negative al test HC2; 389 (68.5%) hanno il follow-up completo. Di queste, 19 (4.9%) sono risultate positive al test HC2 al follow-up: la maggior parte (13/19) appartiene alla fascia di età maggiore di 35 anni, non sono state osservate lesioni e la maggior parte dei tipi di HPV presenti erano a basso rischio.

4.2.4. HPV PROOFER

Per un piccolo numero di campioni è stato effettuato il test per l'espressione dell'mRNA E6/E7 dei tipi 16, 18, 31, 33, 45, utilizzando il kit HPV Proofer (Norchip, Alfawassermann), allo scopo soprattutto di verificare la fattibilità del test in campioni STM, un medium di trasporto non ideale per la conservazione dell'RNA. Sono stati analizzati 64 campioni appartenenti a 50 donne; 5/64 campioni (7.8%) sono risultati inadeguati e tutti i casi positivi al test HPV Proofer hanno dimostrato lo stesso tipo di HPV identificato nel DNA, come riassunto in Tabella 14.

Tabella 14. Risultati del Test HPV Proofer in campioni dello studio ASC-US

	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	Non tipizz/altri tipi
N° casi	21	9	13	2	19
Proofer positivi	15/21 (71.4%)	4/9 (44.4%)	1/13 (7.6%)	1/2 (50%)	
Proofer negativi	6	4	9	1	17
Non adeguati		1	2		2

Totale campioni = **64**

Totale Donne = **50**

4.3. STUDIO NTCC

Nella prima fase del trial (Maggio-Dicembre 2002) a Padova sono state arruolate 4.060 donne: 2.030 nel braccio convenzionale e 2.030 nel braccio sperimentale.

Nella seconda fase del trial (Settembre 2003-Dicembre 2004) sono state inserite nello studio 6.516 donne: 3.254 nel braccio convenzionale e 3.262 nel braccio sperimentale.

Complessivamente, sono entrate nello studio 10.576 donne dell'ULSS 16: 5.284 assegnate al braccio convenzionale e 5.292 al braccio sperimentale. La distribuzione fra i due bracci è bilanciata nelle diverse fasce di età, mentre la distribuzione per età nelle due fasi risulta diversa, con una maggiore frequenza nella prima fase di donne di età fra 30-50 anni, e una maggiore frequenza nella seconda fase di donne di età <35 e >50 anni, come illustrato nella Figura 25.

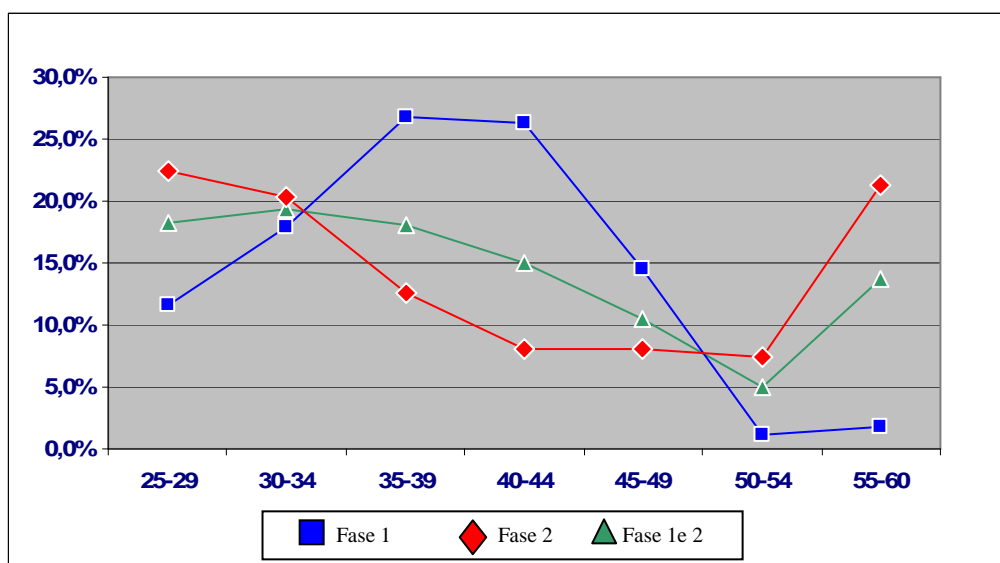


Figura 25. Distribuzione per età delle donne arruolate a Padova nelle due fasi dello studio NTCC

4.3.1. RISULTATI TEST HC2 ALL' ARRUOLAMENTO

Il test HC2 è risultato positivo in 515 casi su 5.292 campioni testati, pari ad una prevalenza globale del 9.7%. La prevalenza per età è risultata essere: 13.2 % nella fascia 25-34 anni, 11.0% nella fascia 35-44 anni, e 4.0% nella fascia 45-60 (Figura 26).

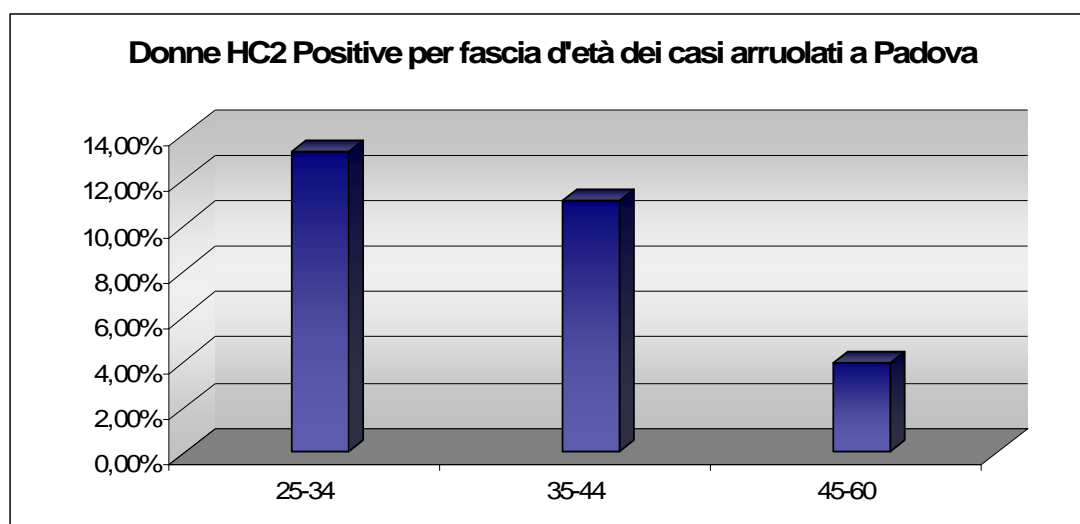


Figura 26. Risultati del test HC2 all'arruolamento nello studio NTCC

Il risultato del test HC2 è stato espresso come rapporto RLU/PC (unità di luce relativa/calibratore positivo); nei 515 campioni positivi (con un rapporto >1) è risultato <5 in 158 campioni (31%), fra 5 e 10 in 41 campioni (7.8%), fra 10 e 50 in 94 campioni (18.2%), e >50 in 221 campioni (43%).

4.3.2. TIPIZZAZIONE CAMPIONI POSITIVI AL TEST HPV (HC2+)

Prima dell'applicazione del kit prototipo "Consensus High Risk HPV Genotyping" (Digene, di seguito indicato come Line Blot o LB) tutti i centri partecipanti al progetto NTCC hanno testato la concordanza, la sensibilità e la riproducibilità del metodo, utilizzando campioni precedentemente tipizzati con altri metodi. Nel nostro laboratorio i campioni erano stati tipizzati con la digestione enzimatica (RFLP) di amplificati MY09/MY11: i risultati ottenuti su 11 campioni testati hanno dimostrato concordanza per 9 (81.8%) mentre due sono risultati discordanti (18%). Uno dei due campioni discordanti è stato tipizzato con la metodica LB (HPV16, HPV51, HPV56), mentre con la digestione enzimatica (RFLP) era risultato negativo; l'altro campione è stato tipizzato con la digestione (HPV 35) mentre con LB era risultato non tipizzabile. La concordanza è risultata >80% anche negli altri centri di screening, mostrando in questo modo una buona riproducibilità del test.

Successivamente è stata valutata la sensibilità interlaboratorio utilizzando un plasmide commerciale di HPV 16 fornito dal kit HC2 (QC High Risk Quality Control, Digene), testato intero e in varie diluizioni come indicato in Figura 27: il numero delle copie HPV 16 varia da 2500 copie/ μ l (intero) fino a 0.31 copie/ μ l (dil 1:8000). Nella reazione di PCR con primers GP5+/6+ è stato possibile vedere fino a 2.5 copie/ μ l (1:1000) (Figura 27). Dopo ibridizzazione con LB era possibile vedere fino a 1.66 copie/ μ l (1:1500). Gli stessi risultati sono stati ottenuti anche dagli altri centri di screening.

Marker
 Intero
 Dil 1:10
 Dil 1:100
 Dil 1:1000
 Dil 1:1500
 Dil 1:2000
 Dil 1:4000
 Dil 1:8000
 Contr. Neg

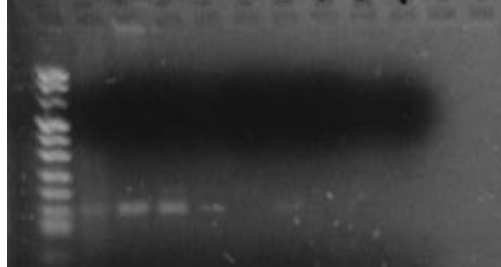


Figura 27. Prova di sensibilità della PCR GP5+/6+ con plasmide HPV 16 a varie concentrazioni.

Per i 515 campioni HC2 positivi dello studio NTCC l'algoritmo di tipizzazione prevedeva l'amplificazione della regione L1 con i primers GP5+/6+ e la tipizzazione LB e successiva analisi dei campioni negativi con primers MY09/11 e RFLP e/o con primers GP5+/6+ e sequenziamento. Sono risultati tipizzabili 470 (91.2%) campioni di cui: 419 (89.1%) sono stati tipizzati con la metodica LB (Figura 28) e 51 (10.69%) con PCR MY09/MY11 e RFLP o con analisi di sequenza. 42 casi sono risultati negativi con tutti i primers (8.16%), su 2 campioni non è stata eseguita nessuna indagine e 1 è risultato β -globina negativo.

I tipi più frequenti sono risultati: HPV 16 (32.9%), HPV 18 (13.4%), HPV 31 (7.6%) e HPV 45 (5.5%) (Tabella 15).

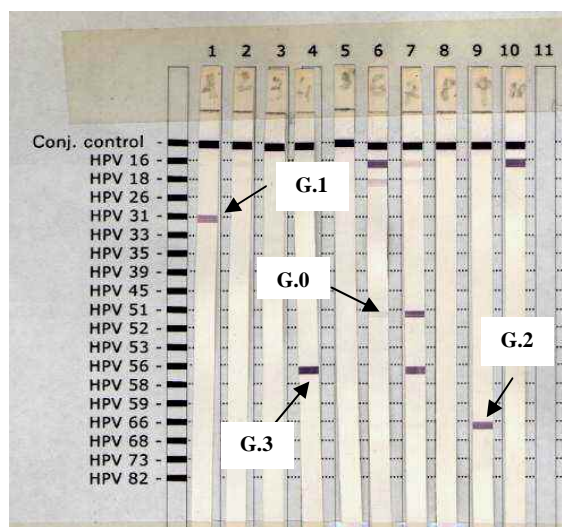


Figura 28. Risultati Line Blot (LB) studio NTCC dopo 30 minuti di incubazione. Le frecce indicano le diverse intensità del segnale. G = grading, 0 (segnale molto debole), 1 (segnale debole), 2 (segnale normale), 3 (segnale forte).

Tabella 15. Prevalenza per tipo HPV nello studio NTCC

TIPO HPV	N° casi totali	N° casi infesz. singola	N° casi infesz. mista	%
6	4	4	0	0.85
16	155	125	30	32.98
18	63	43	20	13.40
31	36	33	3	7.66
33	8	8	0	1.70
35	11	10	1	2.34
39	6	5	1	1.28
42	1	1	0	0.21
45	26	25	1	5.53
51	12	12	0	2.55
52	7	7	0	1.49
53	17	13	4	3.62
54	1	1	0	0.21
56	29	28	1	6.17
58	19	18	1	4.04
59	18	18	0	3.83
61	4	4	0	0.85
66	24	24	0	5.11
67	4	4	0	0.85
68	3	3	0	0.64
70	9	8	1	1.91
73	2	2	0	0.43
82	3	3	0	0.64
84	1	1	0	0.21
X*	7	7	0	1.49
Totale	470	407	63	100

* HPV X: tipo nuovo o tipo non ancora identificato

Sono stati identificati 77 (14.9%) casi di infezione con tipi la cui sonda non è contenuta nel mix HC2, e per i quali il risultato positivo al test HC2 è dovuto a cross-ibridazione. I tipi identificati sono descritti nella tabella sottostante:

Tabella 16. Tipi di HPV identificati la cui sonda non era compresa nel mix HC2.

Tipo HPV	6	42	53	54	61	66	67	70	73	82	84	X	Totale
Totale	4	1	17	1	4	24	4	9	2	3	1	7	77

* HPV X: tipo nuovo o tipo non ancora identificato

DONNE CON LESIONI

Fra le 515 donne con test HC2 positivo sono state identificate 43 lesioni CIN2 e 28 lesioni CIN3+ (14 CIN3, 13 carcinomi in situ e 1 carcinoma microinvasivo). Per la maggior parte delle donne che hanno sviluppato una lesione di alto grado la diagnosi è stata fatta entro 2 anni dal momento dell'arruolamento. Il 54% delle lesioni era presente nelle donne con età <35 anni e il 46% nelle donne con età >35 anni (Tabella 17).

Tabella 17. Distribuzione per età delle donne con lesioni

Fascie di età	CIN2	CIN3+	Totale
<35 anni	25	14	54% (39/71)
>35 anni	18	14	46% (32/71)

La Tabella 18 riporta i risultati della tipizzazione di 69 casi con lesioni di alto grado: il tipo maggiormente riscontrato è stato l'HPV 16 (53.6%), seguito da HPV 18 (15.4%).

Nelle donne con lesioni CIN2 sono state identificate 38 infezioni singole e 3 infezioni multiple; nelle donne con lesioni CIN3+ invece sono state identificate 21 infezioni singole e 6 infezioni multiple.

Tabella 18. Tipi di HPV nelle donne con lesioni

Tipo HPV	CIN2	CIN3+	Totale
6	2	1	3
16	17	20	37
18	9	2	11
31	0	1	1
33	2	0	2
35	3	0	3
39	0	1	1
45	2	0	2
51	1	1	2
56	3	0	3
58	2	1	3
59	1	0	1
Totale	42	27	69*

* 2 casi non sono stati riportati in tabella: 1 negativo e 1 no banca.

4.3.3. ANALISI DEL RAPPORTO RLU/PC DEL TEST HC2

Abbiamo confrontato il rapporto di emissione di luce RLU/PC del test HC2 nei campioni delle donne con e senza lesioni e nei campioni che sono risultati negativi alla PCR. Un rapporto RLU/PC >50 è stato osservato nel 58.2% delle donne con lesioni CIN2, nell'82.1% di quelle con CIN3+ e nel 2.4% dei campioni PCR negativi (Tabella 19).

Tabella 19. Studio NTCC: frequenza di RLU/PC (test HC2).

Variabile	RLU/PC				Totale
	<5	5-10	10-50	>50	
Donne con lesioni					
CIN2	11 (25.6%)	3 (7%)	4 (9.3%)	25 (58.2%)	43
CIN3+	1 (3.6%)	2 (7.2%)	2 (7.2%)	23 (82.1%)	28
Donne senza lesioni					
PCR pos	23 (82.1%)	36 (8.2%)	88 (19.8%)	173 (39%)	444
PCR neg	31 (74%)	5 (12%)	5 (12%)	1 (2.4%)	42

La differenza del rapporto RLU/PC dei campioni di donne con lesioni sia CIN2 che CIN3+ in confronto ai campioni PCR negativi è statisticamente molto significativa ($p < 0.0001$).

La distribuzione del rapporto RLU/PC è stata analizzata in relazione al tipo di HPV identificato nelle donne con lesioni di alto grado: la grande maggioranza dei campioni HPV 16 positivi 27/33, (81.8%) e 11/17 (64.7%) campioni con tipi ad alto rischio (16 e 18 esclusi) hanno mostrato un rapporto >50 , mentre per gli altri tipi non si sono osservate differenze (Figura 29).

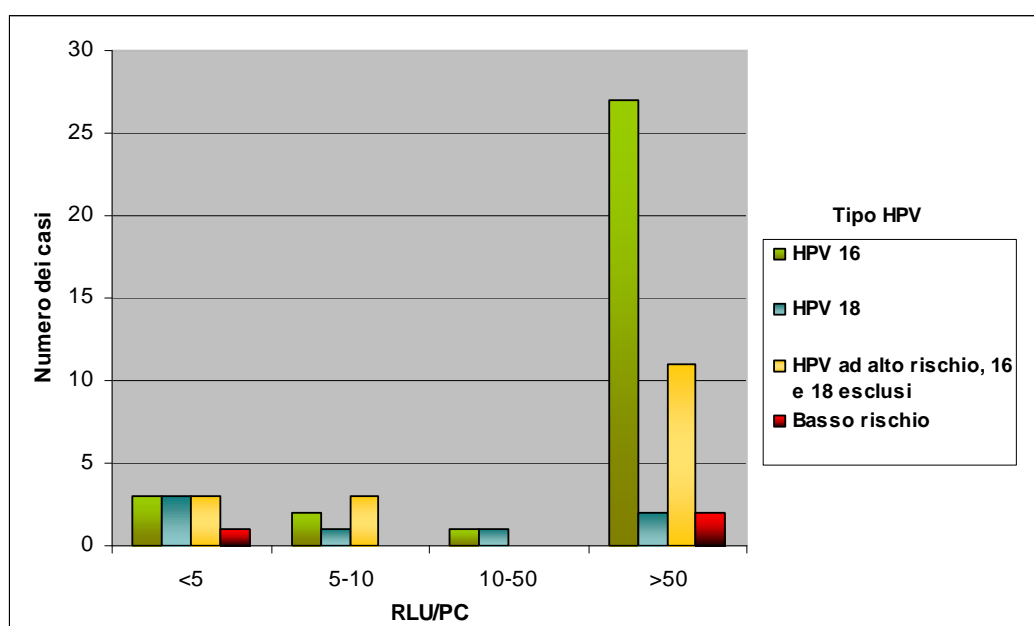


Figura 29. Rapporto RLU/PC e tipo HPV nelle donne con lesioni e infezione singola.

4.4. CONFRONTO FRA LE METODICHE DI TIPIZZAZIONE

Nei tre diversi studi presentati sono state utilizzate strategie di prelievo/conservazione, estrazione di DNA, PCR e tipizzazione diverse. Questo permette di valutare i risultati anche da un punto di vista tecnico, per mettere in evidenza le differenze e i possibili vantaggi e svantaggi delle diverse metodiche; verranno confrontati gli studi ASC-US e NTCC.

I campioni utilizzati nello studio ASC-US sono cellule cervicovaginali in soluzione STM. Per la ricerca del DNA del Papillomavirus umano (HPV) è stato utilizzato il test HC2 con sonde per tipi ad alto rischio. Come metodica principale

per la tipizzazione dei campioni HC2 positivi è stata utilizzata la reazione di PCR con i primers MY09/11 e la digestione enzimatica (RFLP) dei campioni positivi. I campioni negativi alla PCR MY09/11 sono stati analizzati con i primers GP5+/6+ con sequenziamento diretto dell'amplificato. I campioni risultati negativi o non tipizzati sono stati analizzati con i primers SPF₁₀ utilizzando il kit commerciale INNO-LiPA Genotyping Extra Amp (Innogenetics). È stato possibile tipizzare 163 casi (127 infezioni singole e 36 infezioni miste): 138 casi con MY e RFLP (107 infezioni singole e 31 multiple), 20 infezioni singole con la sequenza di amplificati GP e 5 infezioni multiple con INNO-LIPA. I tipi più frequenti sono risultati: HPV 16 (27.6 %), HPV 31 (12.9 %) e HPV 18 (7.9 %).

I campioni risultati HPV 16 positivi (45 campioni) sono stati ulteriormente analizzati con primers tipo-specifici per la regione E6 di HPV 16. Sono risultati positivi 41/45 casi (91.1%) e negativi 4/45 (8.9%), con una completa concordanza fra la PCR tipo-specifica e la tipizzazione con MY + RFLP (41/41, 100%), mentre i discordanti erano stati testati con INNOLIPA.

I campioni utilizzati nello studio NTCC sono cellule esfoliate cervico-vaginali conservate in soluzione Thin Prep (Cytoc) o in soluzione STM (Standard Transport Medium). Per la ricerca del DNA del Papillomavirus umano (HPV) è stato utilizzato il test HC2 con sonde per tipi ad alto rischio. Come metodica principale di tipizzazione è stata utilizzata l'amplificazione della regione L1 con i primers GP5+/6+ e successiva ibridizzazione con il metodo LB. È stato eseguito il protocollo raccomandato dalla ditta produttrice, con una modifica per i casi in cui l'intensità del segnale sulla striscia era molto debole o negativo, il cui tempo di incubazione con il substrato è stato prolungato fino a 2 ore. L'intensità della banda osservata sulla striscia è stata valutata con: grading 0 (segnale molto debole, appena visibile), grading 1 (segnale debole), grading 2 (segnale con intensità normale) e grading 3 (segnale forte).

Dei 515 campioni HC2 positivi è stato possibile tipizzare 419 casi con la metodica LB: **137** casi con segnale di *grading 3* (tutti con un tempo di incubazione di 30 minuti), **110** casi di *grading 2* (81 casi incubati per 30 minuti e 29 casi per 2 ore), **118** di *grading 1* (65 incubati per 30 minuti e 53 per 2 ore), **54** di *grading 0* (tutti lasciati ad incubare per 2 ore) (Tabella 20).

Tabella 20. Intensità del segnale sulla striscia della metodica LB

Grading	0	1	2	3
Singole	41	98	97	126
Multiple	13	20	13	11
Totale	54	118	110	137

Per 65/155 (41.9%) campioni HPV 16 positivi con LB è stata eseguita la PCR tipo-specifica per la regione E6. I dati ottenuti hanno mostrato una concordanza del 11.3% (4/36) per campioni con grading 0-1 e del 82.7% (24/29) per quelli con grading 2-3, che potrebbe indicare una maggiore sensibilità del LB rispetto alla PCR tipo-specifica.

Dei 93 campioni non tipizzati con la metodica precedente, 38 sono stati tipizzati con primers MY09/11 e RFLP (32 infezioni singole e 6 infezioni miste), e 13 sono stati tipizzati con primers GP5+/6+ e analisi di sequenza (tutte infezioni singole). 42 casi sono risultati negativi con tutti i primers.

In 31 dei 51 casi negativi al LB sono stati identificati tipi la cui sonda non era presente nelle strisce: 19 casi sono stati identificati con MY09/11 e digestione enzimatica, 12 casi con GP5+/6+ e sequenziamento. Il tipo più frequentemente riscontrato è stato HPV 70 con 9 casi (Tabella 21).

Tabella 21. Tipi HPV non compresi nelle sonde LB

Tipo HPV	MY09/11 e RFLP	GP5+/6+ e Sequenza
6	3	1
42	0	1
54	1	0
61	4	0
67	1	3
70	9	0
84	1	0
X*	0	7
Totale	19	12

* HPV X: tipo nuovo o tipo non ancora identificato

In 20 dei 51 casi sono stati invece identificati tipi la cui sonda era presente nelle strisce. Abbiamo analizzato la frequenza relativa di questi tipi fra le diverse metodologie utilizzate. Dei 17 casi HPV 53, 14 (82.36%) sono stati tipizzati con MY09/11 e digestione e 3 (17.64%) con la metodica GP5+/6+ e LB. Dei 19 casi HPV 58, 17 (89.47%) sono stati tipizzati con GP5+/6+ e LB, e 2 (10.53%) con MY09/11 e digestione. Dei 7 casi HPV 52, 6 (85.71%) sono stati tipizzati con GP5+/6+ e LB e 1 (14.29%) con MY09/11 e digestione. Dei 3 casi HPV 68, 2 (66.66%) sono stati tipizzati con LB e 1 (33.34%) con MY09/11 e digestione. Dei 3 casi HPV 82, 2 (66.66%) sono stati tipizzati con GP5+/6+ e LB, e 1 (33.34%) con MY09/11 e digestione. Dei 24 casi HPV 66, 23 (95.84%) sono stati identificati con GP5+/6+ e LB, e 1 (4.16%) è stato identificato con GP5+/6+ e sequenziamento (Figura 30). I risultati indicano una bassa sensibilità nella rilevazione di HPV 53 con PCR GP5+/6+ e LB, dovuta prevalentemente alla bassa sensibilità dei primers GP di amplificare questo tipo di HPV.

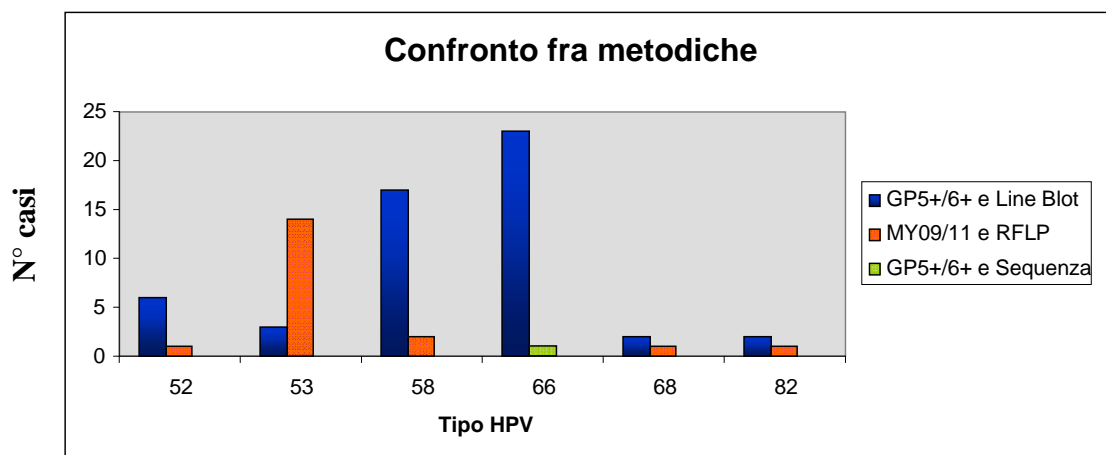


Figura 30. Tipi HPV identificati con più metodiche: frequenza relativa fra le diverse strategie.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Virtualmente tutti i casi di carcinoma della cervice uterina sono causati dall'infezione persistente con uno di circa quindici tipi di HPV fra i più di 100 finora identificati. Il potere oncogeno dei diversi tipi di HPV differisce grandemente, e la maggioranza delle infezioni è transiente e si risolve spontaneamente nell'arco di 1-2 anni.

La ricerca di sequenze HPV può quindi essere utile nella prevenzione e nella gestione delle lesioni cervicali. Possono essere utilizzate diverse strategie metodologiche, che differiscono tra loro per vari aspetti. Alcuni test identificano gruppi di HPV senza distinguere i tipi specifici, altri possono definire i tipi coinvolti, ma con diversa sensibilità per tipi diversi; i campioni per i quali è più difficile ottenere risultati consistenti e riproducibili sono quelli che contengono più tipi contemporaneamente e/o infezioni con bassa carica virale.

Abbiamo effettuato la ricerca e la tipizzazione di sequenze HPV in diverse casistiche. Il primo obiettivo degli studi ASC-US e NTCC era valutare la sensibilità e la specificità di un test HPV per individuare donne con o a maggiore rischio di sviluppare lesioni di alto grado, nel triage in caso di diagnosi citologica di ASC-US e come test primario nello screening, in confronto alle strategie attualmente in uso. È importante sottolineare che l'efficacia clinica è raggiunta quando il test è in grado di individuare tutte (o quasi) le lesioni di alto grado (sensibilità) evitando quanto più possibile di inviare a ulteriori approfondimenti le donne che non hanno una lesione di alto grado (specificità). Il test HC2 che abbiamo utilizzato rileva infezioni con tipi di HPV ad alto rischio senza identificare gli specifici tipi.

Nello studio ASC-US, una lesione di alto grado è stata riscontrata nel 15% delle donne HC2 positive e nello 0.35% delle donne HC2 negative all'arruolamento. Dai nostri risultati, ottenuti confrontando Pap test, test HC2 e colposcopia, è stato osservato che il test HPV è più sensibile (93.1%) e più specifico (78.6%) rispetto alla colposcopia (79.3% e 67.6%) e alla ripetizione del Pap test (74.1% e 72.3%). I dati ottenuti concordano con i risultati riportati in una meta-analisi [71] sull'uso del test HPV nel triage delle donne con diagnosi di ASC-US in confronto al Pap

test: la sensibilità e specificità complessiva del test HPV erano 84.4% e 72.9%, rispettivamente, vs 81.8% e 57.6% del Pap test. Tra i vari studi della meta-analisi va citato lo studio ALTS (ASC-US Low SIL Triage Study) [72]: sulla base di questi dati, negli Stati Uniti l'American Society for Colposcopy and Cervical Pathology indica il test HPV come opzione ottimale per il triage delle donne con la diagnosi ASC-US [73]. Gli studi locali di valutazione del test HPV rispetto alla ripetizione del Pap test o alla colposcopia sono utili perché la diagnosi di ASC-US è una diagnosi poco riproducibile, con variazioni di prevalenza sia geografiche che temporali.

L'utilizzo del test HPV nello screening è stato valutato in diversi studi clinici randomizzati, o in aggiunta al Pap test o come unico test. I risultati sono concordi nella maggiore sensibilità del test HPV, anche utilizzato da solo. Il problema su cui si sta ancora lavorando è la minore specificità del test HPV, dovuta alla rilevazione di infezioni HPV clinicamente non rilevanti, infezioni cioè di tipo transiente che non provocano lesioni di alto grado. Queste infezioni sono più frequenti nelle donne giovani. Lo studio NTCC è un trial multicentrico randomizzato che ha arruolato circa 95.000 donne in 9 centri di screening in Italia. Le donne assegnate al braccio convenzionale hanno fatto il Pap test, le donne assegnate al braccio sperimentale hanno fatto test HPV e citologia in fase liquida nella 1^a fase dello studio e solo il test HPV nella 2^a fase.

Nella 1^a fase è stata fatta una gestione differenziata per le donne <35 anni.

Per il centro di Padova hanno partecipato 10.576 donne di età tra 25-60 anni; di queste, 5.292 sono state assegnate al braccio sperimentale e hanno eseguito il test HC2, che è risultato positivo in 515 casi, pari ad una prevalenza globale del 9.7%. La prevalenza per età è risultata del 13.2% nella fascia 25-34 anni, 11.0% nella fascia 35-44 anni e 4.0% nella fascia 45-60.

Sulla base delle lesioni identificate CIN2+ è stata valutata la sensibilità e la specificità del test HC2 rispetto al Pap test in tutto lo studio NTCC. Il test HC2 ha mostrato una sensibilità più alta del Pap test (97.3% vs 74%) ma una minore specificità (93.2% vs 94.8%). La minore specificità ha comportato un aumento di due- tre volte degli invii a colposcopia nel braccio sperimentale rispetto al braccio convenzionale. Sono state perciò valutate alcune possibili strategie per selezionare

le donne a maggior rischio e per gestire in modo conservativo le donne con probabile infezione transiente.

Aumentando il valore soglia da 1 a 2 pg/ml la specificità del test migliora (da 93.2% a 94.9%) mantenendo una buona sensibilità (da 97.3% a 96.0%) [65] [66], in linea con quanto osservato anche da altri autori.[74].

Le infezioni transienti sono molto più frequenti nelle donne giovani, e quindi è stata analizzata la sensibilità e la specificità del test HPV per due fasce d'età, maggiore ed inferiore a 35 anni. La specificità è risultata essere maggiore nelle donne sopra 35 anni rispetto a quelle più giovani: 84.8% e 60.4%, rispettivamente, nello studio ASC-US, a conferma che nelle donne >35 anni l'infezione HPV si associa più frequentemente che nelle donne <35 anni a lesioni di alto grado. La maggiore sensibilità/minore specificità nelle donne <35 anni è risultata particolarmente rilevante nello studio NTCC, il cui disegno ha però messo in evidenza che le donne HPV-positive con citologia negativa anziché essere inserite a colposcopia possono essere rivalutate a 12 mesi con ripetizione di test HPV e citologia: più della metà delle infezioni è risultata risolta e non sono state rilevate lesioni di alto grado [66].

I campioni HC2 positivi di entrambi gli studi sono stati analizzati mediante amplificazione con primers consenso per la regione L1 allo scopo di definire il/i tipo/i presente/i. Abbiamo fatto la tipizzazione usando a cascata dei primers consenso che riconoscono la stessa regione del genoma HPV ma che danno origine ad amplificati di diversa lunghezza. Nello studio ASC-US, dei 181 campioni HC2 positivi all'arruolamento sono risultati tipizzabili 163 (90%), i 36 rimanenti sono risultati o non amplificabili o negativi con tutti i primers utilizzati. Nello studio NTCC, dei 515 campioni HC2 positivi all'arruolamento sono risultati tipizzabili 470 (91.8%), in linea con quanto osservato nello studio ALTS [75] e in altri studi sull'utilizzo del test HC2 come test primario [76]. Le analisi di tipizzazione sono state effettuate per definire la prevalenza dei diversi tipi di HPV in relazione alle lesioni e valutare il significato e il ruolo clinico della tipizzazione, confrontando al contempo le strategie metodologiche utilizzate.

Il tipo più frequente in tutte le casistiche è risultato l'HPV 16 (27.6% nello studio ASC-US; 32.9% nello studio NTCC), con una prevalenza crescente in rapporto alla gravità delle lesioni: 40% circa delle lesioni CIN2, e più del 70% delle lesioni

CIN3 e dei carcinomi [70]. La differenza di prevalenza di HPV 16 fra CIN2 e CIN3+ è risultata statisticamente significativa nelle donne >35 anni.

Diversi studi pubblicati in letteratura riportano dati che dimostrano una maggiore aggressività di HPV 16 rispetto agli altri tipi: maggior persistenza dell'infezione, minore probabilità di regressione delle lesioni, maggiore probabilità di sviluppare una lesione di alto grado o un carcinoma [42] [43] [75] [77], suggerendo il possibile utilizzo della tipizzazione tipo-specifica per HPV 16 e una gestione clinica differenziata per le donne con infezione da tipo 16.

Analizzando le varianti virali dei campioni HPV 16 positivi è emerso che il 71.5% delle lesioni CIN2+ e il 72% dei carcinomi cervicali sono associati alla variante virale europea T350G (L83V), variante caratterizzata da una maggiore aggressività biologica rispetto al prototipo [39] [78]. Il tipo 18 è stato riscontrato nel 13.4% delle donne dello studio NTCC, nel 7.9% delle donne dello studio ASC-US e nel 2.2% dei carcinomi invasivi. La distribuzione geografica di HPV 18 mostra variazioni importanti fra le diverse aree, con prevalenza più bassa in Europa rispetto al resto del mondo [42] [43]. Va sottolineato che nelle nostre casistiche la numerosità dei carcinomi era bassa e la più alta prevalenza osservata nello studio NTCC rispetto allo studio ASC-US potrebbe riflettere la diversa sensibilità dei metodi di tipizzazione usati nei due studi. Da sottolineare che HPV 16 e 18 sono i tipi più frequentemente associati ai carcinomi e sono quelli prevenibili con i vaccini profilattici.

Seguendo la valutazione dello IARC che ha identificato ufficialmente i tipi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66 come agenti cancerogeni [27] abbiamo analizzato i tipi ad alto rischio escludendo il tipo 16 e 18: la frequenza è stata del 43.5% nello studio ASC-US, del 41.7% nello studio NTCC e del 25% nei carcinomi.

La frequenza dei tipi definiti come probabile alto rischio (HPV 53, 68, 73, 82) è stata 10.4% nello studio ASC-US e 5.3% nello studio NTCC: nessuno di questa categoria è stato trovato in associazione a lesioni CIN2+, in linea con quanto riportato in un altro studio, dove la percentuale dei tipi definiti come probabile alto rischio è risultata 2.1% nei casi CIN3+ [77].

Altri tipi (basso rischio e rari) sono stati riscontrati nel 10.4% nello studio ASC-US e nel 6.5% nello studio NTCC; è interessante notare che il tipo HPV 6 è stato trovato in un caso di CIN 2+ nello studio ASC-US e in 3 casi nello studio NTCC. Nella Tabella sottostante sono descritti i tipi di HPV riscontrati nei diversi studi.

Tabella 22. Tipi di HPV riscontrati nei diversi studi

TIPI	NTCC 5292 casi	ASC-US 749 casi	Carcinoma 48 casi
HPV 16	155 (32.9%)	45 (27.6%)	32 (72.7%)
HPV 18	63 (13.4%)	13 (7.9%)	1 (2.2%)
HPV ad alto rischio, esclusi 16 e 18	196 (41.7%)	71 (43.5%)	11 (25%)
HPV probabile alto rischio	25 (5.3%)	17 (10.4%)	0
Altri tipi (basso rischio e rari)	31 (6.5%)	17 (10.4%)	0
Totale tipizzati	470	163	44

Fra i genotipi identificati ci sono anche HPV non compresi nel mix di sonde del test HC2; sono stati trovati 20 campioni nello studio ASC-US (11.3%) e 77 campioni nello studio NTCC (14.9%). I tipi HPV individuati in entrambi gli studi sono: HPV 53 (11 e 17 casi), HPV 66 (6 e 24 casi) e HPV 6 (3 e 4 casi). I risultati ottenuti sono in accordo con altri studi, che mostrano che i tipi 53, 66 e 6 sono quelli più frequentemente rilevati per cross-reattività, con una percentuale molto simile alla nostra (17.8%) [79].

La prevalenza di infezioni multiple riscontrata nelle nostre casistiche è stata del 22% nello studio ASC-US, del 13.4% nello studio NTCC e del 11.4% fra i carcinomi. La frequenza delle infezioni multiple è stata riportata in percentuali variabili nei vari studi pubblicati: dipende in parte dalla metodologia utilizzata (l'analisi di sequenza come metodo di tipizzazione identifica solo le infezioni singole) e dalla composizione delle casistiche (le infezioni multiple sono più frequenti nei soggetti immunodepressi). La frequenza osservata nello studio ASC-US è in linea con quanto osservato (19%) in un altro studio dove era stata utilizzata la stessa strategia di tipizzazione [80]. Nelle nostre casistiche abbiamo osservato che non c'è associazione fra infezione multipla e severità delle lesioni, mentre è meno frequente la clearance.

Abbiamo valutato le diverse metodiche utilizzate negli studi per definire quali sono le caratteristiche più determinanti per una buona efficacia nei diversi ambiti clinici.

Nello screening, sia come test primario del 1° livello sia come test di triage per le donne con diagnosi di ASC-US, il test HC2 con mix di sonde per i tipi ad alto rischio ha mostrato maggiore sensibilità del Pap test, e la possibilità di modificare il cut-off per migliorare la specificità. In entrambi i casi l'obiettivo è quello di identificare le donne con lesioni clinicamente rilevanti e a rischio di sviluppare il carcinoma cervicale. L'accuratezza del test e la specificità sono influenzate dalla frequenza di infezioni transienti (clinicamente non rilevanti) che sono più frequenti nelle donne <35 anni.

Un risultato molto importante e dimostrato in tutti gli studi finora pubblicati è il bassissimo rischio di sviluppare lesioni di alto grado delle donne con test HC2 negativo, un risultato che permetterà di allungare i tempi di intervallo tra un episodio di screening e il successivo.

Per quanto riguarda la tipizzazione, in ambito clinico è importante per valutare la persistenza dell'infezione e come marcatore di rischio di progressione: i risultati ottenuti mostrano un'elevata associazione fra tipo 16 e lesioni di alto grado e carcinomi. Sarà importante valutare se una tipizzazione mirata per identificare le infezioni da HPV 16 sarà utilizzabile o come triage delle donne HC2+ (soprattutto quelle giovani) o per differenziare il 2° livello. Dai nostri dati emerge una diversa sensibilità nel rilevare il tipo 16, e questo potrebbe essere un fattore importante da valutare per definire quale ha la maggiore specificità clinica. La tipizzazione sarà utile nel monitoraggio delle donne vaccinate.

Gli aspetti tecnici da considerare per la ricerca e la tipizzazione dell'HPV sono:

-Tipo, metodo di prelievo e conservazione del campione (cellule in tampone o in fissativo, campioni biotici freschi o inclusi in paraffina). Ad esempio, per il test HC2 nello studio NTCC i campioni erano conservati in soluzione Thin prep o in soluzione STM (Standard Transport Medium): è stato osservato che i campioni in soluzione Thin Prep avevano una riproducibilità più bassa per valori RLU/PC vicini al cut-off rispetto a quelli in soluzione STM; probabilmente questo era dovuto al processo di conversione dei campioni, necessario per eliminare il fissativo [81]. Una buona qualità di DNA è un requisito importante nelle

metodiche che utilizzano l'ibridazione inversa.

-Set dei primers utilizzati per l'amplificazione del DNA: danno origine ad amplificati di diversa lunghezza (l'utilizzo di primers più corti, come GP5+/6+ e SPF₁₀, sono più indicati per analizzare DNA estratto da materiale in paraffina) e hanno diversa sensibilità per alcuni tipi; i primers MY09/11 hanno una minore efficienza nel rilevare HPV 35, i primers GP5+/6+ hanno una minore efficienza nell'identificazione di HPV 53.

-Metodo di tipizzazione: RFLP permette di identificare virtualmente tutti i tipi di HPV (non essendo legata a sonde specifiche) ma l'interpretazione può essere complicata specialmente in casi con pattern di bande molto simili e in alcune infezioni multiple; il sequenziamento identifica solo le infezioni singole; l'ibridazione inversa ha una buona sensibilità nell'identificare le infezioni miste e riesce a vedere anche le infezioni con carica virale bassa. Tutti i metodi di tipizzazione hanno mostrato un'elevata affidabilità nella rilevazione di HPV 16 e HPV 18.

Va comunque sottolineato che non esiste un test ideale per l'identificazione del tipo di HPV e che solo l'utilizzo di una strategia con più metodiche ha permesso, in entrambi gli studi, di tipizzare più del 90% dei campioni. Ogni test ha delle caratteristiche peculiari di sensibilità e specificità nell'identificare i tipi di HPV: la conoscenza di queste caratteristiche permette di scegliere la strategia di volta in volta più utile, eventualmente combinando più di una metodica in particolari situazioni cliniche.

BIBLIOGRAFIA

- 1. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H.** Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324 (1): 17-27. Review.
- 2. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L.** Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 1991; 352 (6338): 824-7.
- 3. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D.** Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 2002; 24 (3): 275-90. Review.
- 4. Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA.** Role of the E1-E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*. 2005; 79 (11): 6732-40.
- 5. Zur Hausen H.** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2 (5): 342-50. Review.
- 6. Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS.** E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer*. 2005; 113 (2): 276-83.
- 7. Thomas M, Pim D, Banks L.** The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. 1999; 18 (53): 7690-700. Review.
- 8. Heideman DA, Steenbergen RD, van der Torre J, Scheffner M, Alemany R, Gerritsen WR, Meijer CJ, Snijders PJ, van Beusechem VW.** Oncolytic adenovirus expressing a p53 variant resistant to degradation by HPV E6 protein exhibits potent and selective replication in cervical cancer. *Mol Ther*. 2005; 12 (6): 1083-90.
- 9. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R.** Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol*. 2001; 75 (9): 4467-72.
- 10. Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ.** Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol*. 2006; 151 (12): 2321-35. Review.

- 11. Felsani A, Mileo AM, Paggi MG.** Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene*. 2006; 25 (38): 5277-85. Review.
- 12. Doorbar J.** Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Clin Sci (Lond)*. 2006; 110 (5): 525-41. Review.
- 13. Longworth MS, Laimins LA.** The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*. 2004; 78 (7): 3533-41.
- 14. Duensing S, Duensing A, Lee DC, Edwards KM, Piboonniyom SO, Manuel E, Skaltsounis L, Meijer L, Münger K.** Cyclin-dependent kinase inhibitor indirubin-3'-oxime selectively inhibits human papillomavirus type 16 E7-induced numerical centrosome anomalies. *Oncogene*. 2004; 23 (50): 8206-15.
- 15. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ.** Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem*. 2000; 275 (10): 6764-9.
- 16. Zwerschke W, Jansen-Dürr P.** Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res*. 2000; 78: 1-29. Review.
- 17. Knipe DM, Roizman B, Howley PM, Griffin D.** *Fields Virology. Fifth edition Lippincott Williams & Wilkins. 2007; Vol 2 (62): 2299-2310.*
- 18. Zur Hausen, H.** Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. [J Natl Cancer Inst](#). 2000; 92 (9): 690-8.
- 19. Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M.** Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*. 2001; 75 (3): 1565-70.
- 20. Culp TD, Budgeon LR, Christensen ND.** Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. *Virology*. 2006; 347 (1): 147-59.
- 21. Howley, P. M. and D. R. Lowy.** Papillomaviruses and their replication. *Fields Virology, Philadelphia (PA): Lippincott-Raven; 2001; 2197-2229.*

- 22. Sterling J, Stanley M, Gatward G, Minson T.** Production of human papillomavirus type 16 virions in a keratinocyte cell line. *J Virol.* 1990; 64 (12): 6305-7.
- 23. Frazer IH.** Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4 (1): 46-54. Review.
- 24. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J.** Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol.* 2003; 77 (19): 10186-201.
- 25. Becker KA, Florin L, Sapp C, Maul GG, Sapp M.** Nuclear localization but not PML protein is required for incorporation of the papillomavirus minor capsid protein L2 into virus-like particles. *J Virol.* 2004; 78 (3): 1121-8.
- 26. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group.** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348 (6): 518-27.
- 27. IARC Working Group.** Human Papillomavirus. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon 2007; vol 90. International Agency for Research on Cancer.
- 28. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, Campisi G.** HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol.* 2008; (10): 1681-90. Review.
- 29. Bulkman NW, Berkhof J, Bulk S, Bleeker MC, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Snijders PJ, Meijer CJ; POBASCAM Study Group.** High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening. *Br J Cancer.* 2007; 96 (9): 1419-24.

- 30. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S.** Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007; 370 (9590): 890-907. Review.
- 31. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L.** HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3: S3/1-10. Review.
- 32. Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group.** Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98 (5): 303-15.
- 33. Castellsagué X, Muñoz N.** Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31: 20-8. Review.
- 34. Madeleine MM, Johnson LG, Smith AG, Hansen JA, Nisperos BB, Li S, Zhao LP, Daling JR, Schwartz SM, Galloway DA.** Comprehensive analysis of HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, and HLA-DQB1 loci and squamous cell cervical cancer risk. *Cancer Res*. 2008; 68 (9): 3532-9.
- 35. Palefsky J.** Human papillomavirus infection in HIV-infected persons. *Top HIV Med*. 2007; 15 (4): 130-3. Review.
- 36. Del Mistro A, Chieco Bianchi L.** HPV-related neoplasias in HIV-infected individuals. *Eur J Cancer*. 2001; (10): 1227-35. Review.
- 37. Castle PE, Giuliano AR.** Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31: 29-34. Review.
- 38. Lillo F, Galli L, Lodini S, Taccagni G, Ferrari A, Orioni M.** Extralesional detection and load of human papillomavirus DNA: a possible marker of preclinical tumor spread in cervical cancer. *J Low Genit Tract Dis*. 2008 ; 12 (3): 204-9.

- 39. Slichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, Villa LL.** High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer.* 2007; 120 (8): 1763-8.
- 40. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N.** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189 (1): 12-9.
- 41. Parkin DM, Bray F.** The burden of HPV-related cancers. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3: S3/11-25. Review.
- 42. Castellsague X, de Sanjose S, Agudo T.** HPV and Cervical Cancer in the world. 2007 report. *Vaccine.* 2007; 25 Suppl 3: C27/C219.
- 43. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL.** HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3: S3/26-34. Review.
- 44. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Muñoz N.** Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine.* 2008; 26 Suppl 10: K1-16. Review.
- 45. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM.** *Globocan 2002: incidence, mortality and prevalence worldwide.* Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2004.
- 46. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop.** The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002; 287 (16): 2114-9. Review.
- 47. Sherman ME, Wang SS, Wheeler CM, Rich L, Gravitt PE, Tarone R, Schiffman M.** Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: dominant impact of surrounding low-grade lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12 (10): 1038-44.

- 48. Koss Leopold G.** Koss' diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases. 2006; Fifth edition, volume 1: 282-394.
- 49. Hubbard RA.** Human papillomavirus testing methods. Arch Pathol Lab Med. 2003; 127(8): 940-5. Review.
- 50. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ.** Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. J Clin Virol. 2005; 32 Suppl 1: S43-51. Review.
- 51. Castle PE, Lorincz AT, Mielzynska-Lohnas I, Scott DR, Glass AG, Sherman ME, Schussler JE, Schiffman M.** Results of human papillomavirus DNA testing with the hybrid capture 2 assay are reproducible. J Clin Microbiol. 2002; 40(3): 1088-90.
- 52. Manos, M. M., Ting, D. K. Wright, A. J. Lewis, T. R. Broker, and S. M. Wolinsky.** Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. Cancer Cells 1989; 7: 209-214.
- 53. Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM.** Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. [J Clin Microbiol.](#) 1995; 33 (4): 901-5.
- 54. Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen K, Burger M, ter Harmsel B, Quint W.** Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. Am J Pathol. 1989; 153 (6): 1731-9.
- 55. Iftner T, Villa LL.** Human papillomavirus technologies. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003; (31): 80-8. Review.
- 56. Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygård JF, Hagmar B.** Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Feb; 14 (2): 367-72.

- 57. Benevolo M, Vocaturo A, Mottolese M, Mariani L, Vocaturo G, Marandino F, Sperduti I, Rollo F, Antoniani B, Donnorso RP.** Clinical role of p16INK4a expression in liquid-based cervical cytology: correlation with HPV testing and histologic diagnosis. *Am J Clin Pathol.* 2008; 129 (4): 606-12.
- 58. Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, De Marco L, Giorgi-Rossi P, Pontenani G, Rosso S, Sani C, Sintoni C, Segnan N, Zorzi M, Cuzick J, Rizzolo R, Ronco G; New Technologies for Cervical Cancer Screening (NTCC) Working Group.** Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2008; 9 (10): 937-45.
- 59. Stanley MA.** Human papillomavirus vaccines. *Rev Med Virol.* 2006; 16(3): 139-49. Review.
- 60. Stanley M.** Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol.* 2008; 109; Suppl 2: S15-21. Review.
- 61. Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Brown DR, Ferenczy A, Harper DM, Koutsky LA, Kurman RJ, Lehtinen M, Malm C, Olsson SE, Ronnett BM, Skjeldestad FE, Steinwall M, Stoler MH, Wheeler CM, Taddeo FJ, Yu J, Lupinacci L, Railkar R, Marchese R, Esser MT, Bryan J, Jansen KU, Singhs HL, Tamms GM, Saah AJ, Barr E.** Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine.* 2006; 24 (27-28): 5571-83.
- 62. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Singhs HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA; Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease (FUTURE) I Investigators.** Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med.* 2007 May 10; 356 (19): 1928-43.

- 63. Ault KA; Future II Study Group.** Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *Lancet*. 2007; 369 (9576): 1861-8.
- 64. Kulasingam SL, Kim JJ, Lawrence WF, Mandelblatt JS, Myers ER, Schiffman M, Solomon D, Goldie SJ; ALTS Group.** Cost-effectiveness analysis based on the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesion Triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98 (2): 92-100.
- 65. Ronco G, Segnan N, Giorgi-Rossi P, Zappa M, Casadei GP, Carozzi F, Dalla Palma P, Del Mistro A, Folicaldi S, Gillio-Tos A, Nardo G, Naldoni C, Schincaglia P, Zorzi M, Confortini M, Cuzick J, and the NTCC Working Group.** Human Papillomavirus testing and liquid-based cytology in primary cervical screening: results at recruitment from the NTCC randomized controlled trial. *JNCI*, 2006; 98: 765-74.
- 66. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Dalla Palma P, Del Mistro A, De Marco L, De Lillo M, Naldoni C, Pierotti P, Rizzolo R, Segnan N, Schincaglia P, Zorzi M, Confortini M, Cuzick J, and the NTCC Working Group.** Human Papillomavirus testing and liquid-based cytology in primary screening of women younger than 35 years: results at recruitment for a randomised controlled trial. *Lancet Oncology*, 2006; 7: 547-55.
- 67. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, Minucci D, Naldoni C, Rizzolo R, Schincaglia P, Volante R, Zappa M, Zorzi M, Cuzick J, Segnan N, and the NTCC Working Group.** Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing Human Papillomavirus testing alone with conventional cytology as the primary cervical cancer screening test. *JNCI* 2008; 100: 492-501.
- 68. Nobre RJ, de Almeida LP, Martins TC.** Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. [J Clin Virol](#). 2008; 42 (1): 13-21.

- 69. Adriaan J. C. van den Brule.** GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol*, 2002; 40 (3): 779-787.
- 70. Del Mistro A, Salamanca HF, Trevisan R, Bertorelle R, Parenti A, Bonoldi E, Zambon P, Minucci D.** Human papillomavirus typing of invasive cervical cancers in Italy. *Infect Agent Cancer*. 2006; 1: 9.
- 71. Arbyn, M., F. Buntinx.** Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96 (4): 280-93.
- 72. Solomon D, Schiffman M, Tarone R; ALTS Study group.** Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93 (4): 293-9.
- 73. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D; 2006 ASCCP-Sponsored Consensus Conference.** 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical screening tests. [J Low Genit Tract Dis](#). 2007; 11 (4): 201-22.
- 74. Castle PE, Solomon D, Wheeler CM, Gravitt PE, Wacholder S, Schiffman M** Human papillomavirus genotype specificity of hybrid capture 2. *J Clin Microbiol*. 2008; 46 (8): 595-604.
- 75. Schiffman M, Wheeler CM, Dasgupta A, Solomon D, Castle PE; The ALTS Group.** A comparison of a prototype PCR assay and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus DNA in women with equivocal or mildly abnormal papanicolaou smears. *Am J Clin Pathol*. 2005; 124 (5): 722-32.
- 76. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, Dillner J, Meijer CJ.** Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*. 2008; 26 Suppl 10: K29-41. Review.

- 77. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM.** Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst.* 2005. 97 (14):1066-71.
- 78. Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, Buonaguro L, Losito S, Botti G, Stellato G, Greggi S, Piccoli R, Pilotti S, Stefanon B, De Palo G, Franceschi S, Buonaguro FM.** Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol.* 2004; 74 (1): 117-26.
- 79. Hesselink AT, Bulkman NW, Berkhof J, Lorincz AT, Meijer CJ, Snijders PJ.** Cross-sectional comparison of an automated hybrid capture 2 assay and the consensus GP5+/6+ PCR method in a population-based cervical screening program. *J Clin Microbiol.* 2006; 44 (10): 3680-5.
- 80. Rousseau MC, Pereira JS, Prado JC, Villa LL, Rohan TE, Franco EL.** Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *J Infect Dis.* 2001;184 (12):1508-17.
- 81. Carozzi FM, Del Mistro A, Confortini M, Sani C, Puliti D, Trevisan R, De Marco L, Tos AG, Girlando S, Palma PD, Pellegrini A, Schiboni ML, Crucitti P, Pierotti P, Vignato A, Ronco G.** Reproducibility of HPV DNA Testing by Hybrid Capture 2 in a Screening Setting. *Am J Clin Pathol.* 2005; 124 (5): 716-21.

PUBBLICAZIONI

Del Mistro A, Frayle Salamanca H, Trevisan R, Bertorelle R, Parenti A, Bonoldi E, Zambon P, Minucci D. Human papillomavirus typing of invasive cervical cancers in Italy. *Infect Agent Cancer.* 2006; 1: 9.

Boscolo Rizzo P, Da Mosto MC, Fuson R, Frayle Salamanca H, Trevisan R, Del Mistro A, HPV 16 E6 L83V variant in squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008 Oct 8.

Sarzo G, Del Mistro A, Finco C, Frayle Salamanca H, Marino F, Franzetti M, Ferrara R, Mistrangelo M, Savastano S, Merigliano S. Extensive anal condylomatosis: prognosis in relation to viral and host factors. Submitted to *Colorectal Disease.*In press.