

SHORT COMMUNICATIONS/NOTE

Valutazione del ruolo dell'HPV-DNA test nei programmi di prevenzione del cancro cervicale

Agostina Ventura¹, Mauro Carcheri¹, Emanuela Caci¹, Patrizia Caligiuri¹, Roberto Capuzzo¹, Ilaria Chiossone¹, Caterina Oliveri¹, Paola Milano¹, Rossana Cirillo², Gianni Tunesi³

¹U.O. Laboratorio Analisi - Dipartimento di Patologia Clinica,

²U.O. Ostetricia e Ginecologia,

³U.O. Anatomia Patologica - Dipartimento di Patologia Clinica

Azienda Ospedaliera Villa Scassi - Corso Onofrio Scassi, 1 - 16149 Genova

Key words: Polymerase Chain Reaction, HPV-DNA test, HSIL, LSIL, ASCUS

Evaluation of the role of HPV-DNA testing in cervical cancer screening programs

SUMMARY

Human Papillomavirus (HPV) infection is the main cause of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) worldwide. Consequently, it would be useful to evaluate HPV testing to screen for cervical cancer. Recently several molecular biological tests able to detect different HPV types and to divide into high and low-risk group have been developed. In this study we examined HPV prevalence and genotype distribution in a group of 446 women and evaluated the role of HPV-DNA testing in cervical screening programs. HPV detection and genotyping were done using a polymerase chain reaction based assay (HPV Typing test).

One hundred and fiftythree of those women had HPV infection (34.5% of the patients); 23 (15%) had low cancer-risk HPV DNA (LR); 116 (75.8%) had high-risk HPV types (HR) and 14 (9%) from both groups.

130 women (85%) in this HPV-infected group had at least one high risk HPV type, and were therefore considered to be at high risk for cancer.

PCR results were not completely comparable with cytological diagnosis.

We conclude that a combination of HPV DNA and cytologic testing has almost 100% sensitivity and negative predictive value. The specificity of the combined test is slightly lower than the specificity of the Pap-test alone but this decrease could potentially be offset by a greater protection from neoplastic progression and cost savings available by extended screening intervals.

INTRODUZIONE

In accordo con le linee guida internazionali lo screening preventivo per il cancro cervicale nel nostro paese "...si basa sul Pap test effettuato ogni tre anni alle donne in età compresa tra i 25 ed i 64 anni" (29). A proposito del test citologico, introdotto nei programmi di screening per il cervico-carcinoma negli anni '60, col passare del tempo sono stati messi, però, in evidenza alcuni problemi i più importanti dei quali riguardano una limitata sensibilità nella rilevazione delle lesioni precoci e la soggettività nell'interpretazione dei risultati. Secondo recenti pubblicazioni il Pap test risulta essere caratterizzato da una specificità media del 98% contro una sensibilità media del 51% (33); questa bassa sensibilità suggerisce che l'impiego del solo Pap test nei programmi di screening per il cervico-carcinoma espone alla possibilità di andare incontro a risultati falsamente negativi e che le donne a cui sia stata notificata una falsa negatività risultano esposte ad un rischio maggiore di sviluppare cancro cervicale (24).

Nel frattempo molti studi clinici, epidemiologici e di biologia molecolare, in special modo due serie di studi organizzati dall'International Agency for Research on Cancer (IARC), hanno messo ampiamente in evidenza come l'infezione da *Human Papilloma virus* (HPV) sia la principale causa di cancro della cervice uterina nonché dei suoi precursori, cioè delle neoplasie intraepiteliali cervicali (CIN) (19, 30). Almeno una dozzina di tipi di HPV, definiti "ad alto rischio" (HR), sono stati riscontrati nel 99% delle biopsie di carcinoma della cervice (12, 41) e secondo una metanalisi del 2003 (8) circa i due terzi dei carcinomi della cervice sono associati al tipo virale HPV 16 (51%) ed al tipo virale HPV 18 (16%). Gli altri tipi di HPV identificati più frequentemente sono, nell'ordine, HPV 45, 31, 33 e 58 (32).

Per questo motivo la determinazione, tramite tecniche di biologia molecolare (14, 26, 27), della presenza del DNA di HPV in campioni biologici prelevati in sede idonea e la tipizzazione del ceppo virale che sostiene l'infezione (specie in

previsione dell'introduzione di vaccini mirati in quanto la risposta immunitaria al virus è tipo-specifica) (21, 22, 23), stanno assumendo una sempre crescente importanza nei programmi di prevenzione di questa neoplasia.

In particolare l'uso di test per l'identificazione di ceppi di HPV ad elevato potenziale oncogeno sembra essere un efficace strumento di prevenzione secondaria, in grado di migliorare il responso predittivo del Pap test soprattutto nel caso di modeste alterazioni cellulari (LSIL) o alterazioni atipiche (ASCUS) (24) e pare ormai assodato che i risultati negativi alla ricerca di HPV-DNA, così come le persistenti positività siano dotati di un elevatissimo potere predittivo nei confronti dell'evoluzione oncogena (42).

A tutt'oggi numerosi test di biologia molecolare risultano in grado di rilevare e tipizzare i diversi sottotipi del virus, anche se peccano per lo più di una eccessiva sensibilità e di una non ancora ottimale standardizzazione, (3) e vedono, almeno nel nostro Paese, il loro impiego nei programmi di screening frenato da un costo ancora abbastanza elevato.

In questi ultimi tempi sta prendendo campo a livello internazionale (20, 32, 37) ed anche nazionale (6, 11) l'ipotesi che la ricerca dell'HPV-DNA con metodiche di biologia molecolare potrebbe, risultare utile soprattutto nei casi nei quali il Pap test risulti positivo per lesioni dubbie o di basso grado, e sulla base di questa ipotesi l'associazione test molecolari-Pap test potrebbe rappresentare un'interessante prospettiva per l'ottimizzazione dei programmi di prevenzione del cancro cervicale (36).

In particolare la ricerca di HPV-DNA e la tipizzazione virale dell'HPV potrebbero andare ad inserirsi in quattro possibili indirizzi di applicazione clinica:

- Screening primario in aggiunta al Pap test: consentirebbe l'allungamento del tempo di intervallo dello screening.
- Dopo Pap test dubbio o con lesioni di basso grado (Low grade Squamous Intraepithelial Lesion: LSIL): per selezionare i soggetti da inviare al secondo livello di diagnosi.
- Follow-up delle CIN 1-2 : per predirne la regressione, persistenza o progressione.
- Follow-up delle pazienti trattate per patologia cervicale.

La ricerca dell'HPV-DNA ha un alto valore predittivo negativo ed è stato riportato che donne negative al Pap test ed all'HPV test hanno un rischio di sviluppare il tumore inferiore o al massimo pari allo 0.2%. Per contro il test ha un basso valore predittivo positivo, soprattutto nelle donne molto giovani nelle quali è alta la prevalenza del-

l'infezione ma anche la possibilità di una sua eradicazione spontanea. Un'infezione transitoria non porta, di solito, al tumore mentre il reperto di un tipo virale HR concomitante ad un Pap test normale segnala un rischio di sviluppare il cancro della cervice maggiore del 7% (47).

Una proiezione matematica americana (28) ha rilevato che associare la ricerca del DNA di HPV al Pap test potrebbe avere un costo aggiuntivo accettabile, a fronte del numero di morti per tumore risparmiate, e ipotizza addirittura il vantaggio economico che potrebbe offrire l'uso dell'HPV-DNA test come test di screening primario, spostando il Pap test in seconda battuta nel triage dei casi positivi.

Sulla base di queste considerazioni, nel 2000, negli U.S.A., la Food and Drug Administration (FDA) ha introdotto la ricerca del DNA di HPV su campioni di cytobrush cervicale per decidere il follow up delle donne con Pap test anomalo e, dal marzo 2003, ha esteso a tutte le donne sopra i 30 anni l'indicazione di tale ricerca in associazione al Pap test stesso. La metodica di biologia molecolare raccomandata è l'Hybrid Capture 2 – Digene, accreditato di una sensibilità clinica del 96% e di un valore predittivo negativo del 99% (5).

In Italia, il Gruppo Italiano Screening del Cervicocarcinoma (GISCi) ha formulato una proposta di consenso sull'utilizzo del test di ricerca del DNA di HPV-HR nel triage delle diagnosi citologiche di atipia squamosa di significato indeterminato e nel follow-up delle lesioni CIN2-3, come indicatore di rischio di recidiva, in alternativa alle procedure di invio diretto in colposcopia o ripetizione dell'esame citologico a sei mesi, basandosi sui risultati di studi internazionali (meta-analisi di Arbyn - 2004) (1), confermati anche da studi italiani (6, 11, 37), che evidenziano che il triage con il test HPV è più sensibile della ripetizione del Pap test a 6 mesi e altrettanto sensibile quanto la colposcopia immediata; pertanto ritiene di raccomandare l'utilizzo del test HPV nel triage delle diagnosi citologiche di ASCUS, pur non escludendo definitivamente le altre due opzioni. Le metodiche validate allo scopo dal GISCi sono il test Hybrid Capture 2 (HC2) e i metodi in PCR basati sull'uso di Primers Consensus (MY09/11 e GP5+/6+) (8).

Per contro, le linee guida della Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia (SIGO) per quanto riguarda l'approccio successivo alla diagnosi di ASCUS o LSIL, pur prendendo in considerazione le tre possibili opzioni (ripetizione del Pap test dopo 6 mesi, tipizzazione virale e colposcopia) stabiliscono tuttora che tutte le pazienti con diagnosi citologica di SIL e anche di ASCUS e di AGUS (Atypical glandular cells of undetermina-

ted significance) vengano sottoposte all'esame colposcopico, quale indagine di secondo livello. Durante la ASCCP (American Society of Colposcopy and Cervical Pathology) Consensus Conference (6-8 settembre 2001) organizzata dal National Cancer Institute – Bethesda (17, 46) sono stati presentati studi che mostrano che, quando l'HPV-DNA test ed il Pap test vengono eseguiti insieme, la sensibilità nell'individuare una neoplasia intraepiteliale di grado 2 e 3 o un tumore invasivo è superiore al 95% (28, 45).

Il vantaggio offerto dall'aggiunta al Pap test del test HPV-DNA per genotipi virali ad alto rischio (HR) sembra quello di poter individuare non solo donne con patologia cervicale, ma anche identificare le donne che sono a rischio di sviluppare in un futuro un carcinoma della cervice. Le conclusioni del "Consensus" indicano che le donne con Pap test normale ma positive alla ricerca di HPV-DNA a livello cervicale presentano un rischio di sviluppare lesioni squamose intraepiteliali di alto grado decisamente maggiore rispetto alle donne negative alla ricerca di HPV-DNA e pertanto dovrebbero ripetere entrambi i test dopo 6-12 mesi, mentre nel caso di negatività per entrambi i test potrebbe essere ipotizzato l'allungamento del tempo di intervallo dello screening sino a 5 anni. Tuttavia l'applicazione di un test di ricerca del DNA del virus in un programma di screening rimane attualmente in fase di valutazione sulla base dell'analisi costo-benefici.

Più accettabile sembra invece l'applicazione del test per la ricerca dell'HPV in donne che abbiano avuto un esito anormale al Pap test. A questo proposito numerosi studi effettuati su gruppi di donne con esito citologico di cellule squamose atipiche di incerto significato (ASCUS) o lesione intraepiteliale di basso grado (LSIL) evidenziano una ottima sensibilità e una discreta specificità del test HPV-DNA nell'individuare i casi di lesioni intraepiteliali di alto grado (HSIL), da inviare subito alla colposcopia (11, 34).

Il test molecolare di ricerca di HPV-DNA può trovare, pertanto, un importante ruolo proprio nella categoria di donne con Pap test LSIL o ASCUS per la capacità di selezionare gruppi di pazienti a più elevato rischio di presenza di lesioni gravi, oppure di confermare la scarsa rilevanza della lesione che necessita di semplice follow-up (39) e, nel caso delle donne con età superiore ai 30 anni, se eseguito in coppia, potrebbe migliorare in modo decisivo la potenzialità di risposta del Pap test, specie se quest'ultimo venisse eseguito con le nuove tecniche di citologia a strato sottile (monostrato o a base liquida – LBC).

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la prevalenza di infezione da HPV in un cam-

pione di donne che si sono presentate nell'arco di circa due anni presso gli Ambulatori dell'A.O. Villa Scassi per sottoporsi ad accertamenti di prevenzione nei confronti del cervico-carcinoma, la prevalenza dei diversi vireotipi nel gruppo delle donne riscontrate positive e di valutare se l'impiego anche di un test, come quello utilizzato nel corso dello studio, possa, e in quali casi, condurre ad una migliore definizione della diagnosi che si può ottenere con l'uso del solo Pap test.

MATERIALI E METODI

Pazienti e raccolta campioni

È stato preso in esame un gruppo, selezionato casualmente, di donne che si sono presentate nel periodo 2002-2004 presso gli ambulatori dell'A.O. "Villa Scassi" per eseguire indagini di prevenzione del carcinoma della cervice (Pap test, colposcopia, biopsia) sulle quali è stata eseguita anche la ricerca del DNA di HPV mediante polymerase chain reaction (PCR).

I campioni pervenuti sono stati raccolti mediante brushing cervicale.

Il campione prelevato è stato successivamente inserito in un apposito flacone sterile contenente 0.5 ml di soluzione di trasporto (una miscela di penicillina a 10000U/ml, streptomina a 10 mg/ml e anfotericina a 25 mg/ml in fisiologica sterile) e conservato a -20°C sino al momento dell'esecuzione della PCR.

La ricerca dell'HPV-DNA è stata eseguita su campioni provenienti da 301 pazienti con diagnosi citologica negativa, da 94 con citologia classificata LSIL e da 51 casi classificati HSIL.

L'età media delle partecipanti allo studio è risultata di 31.8 anni, con distribuzione per fasce d'età presentata in tabella 1.

Tabella 1. Distribuzioni pazienti per fascia di età

INTERVALLO ETÀ	20-30	31-35	36-40	>40
Numero pazienti	126	109	75	136
Percentuale (%)	28.3	24.4	16.8	30.5

Il 42.4% delle pazienti comprese nella fascia d'età tra i 20 ed i 30 anni ha dichiarato di avere normalmente rapporti sessuali con più partner e il 39.6% di non fare uso di preservativo durante i rapporti, nella fascia 31-45 la percentuale è stata del 24.65 (21.35 no preservativo), in quella 36-40 del 31.3% (25.6% no preservativo), in quella >40 del 12.7% (11.6% no preservativo).

Test HPV

Per la ricerca dell'HPV-DNA nei campioni in esame è stato utilizzato il kit HPV Typing (Nuclear Laser Medicine srl) che consente la rilevazione e tipizzazione dei vari tipi di papilloma-

virus umani considerati a basso rischio (6, 11) e ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66) di trasformazione neoplastica. Il metodo è basato sull'amplificazione simultanea di due (6, 11) o quattro tipi di HPV e di un controllo interno (IC). Il test permette di rilevare la presenza e di differenziare 14 tipi di *papillomavirus* umani e viene eseguito in quattro provette per ogni campione. I *papillomavirus* umani ricercati nel test hanno diversa lunghezza del frammento amplificato e questo permette la loro genotipizzazione. Il DNA bersaglio del controllo interno è il DNA del gene β -globinico che deve essere quindi presente in tutti i campioni.

Per ciascun campione sono state utilizzate quattro provette mix di primer:

- 1) PCR mix «16-35»: primers per i tipi virali 16, 31, 33, 35, nucleotidi, controllo interno.
- 2) PCR mix «18-59»: primers per i tipi virali 18, 39, 45, 59, nucleotidi, controllo interno.
- 3) PCR mix «52-66»: primers per i tipi virali 52, 56, 58, 66, nucleotidi, controllo interno.
- 4) PCR mix «6, 11»: primers per i tipi virali 6, 11, nucleotidi.

La qualità della seduta analitica è stata messa sotto controllo includendo un Controllo Positivo ed un Controllo Negativo in ognuna delle quattro sequenze di mix e, per i tipi virali HPV 16 e HPV 18 includendo anche quattro controlli esterni costituiti da genoma completo di HPV 16 e HPV 18 clonato in plasmide e purificato mediante centrifugazione in gradiente di cloruro di cesio, in buffer Tris 10 mM pH 8.0, 1 mM EDTA. Per i due virus sono stati utilizzati campioni a basso titolo (1×10^4 copie/ μ l) e ad alto titolo (1×10^7 copie/ μ l), nella quantità di 10 μ l di campione in 200 μ l di siero negativo (Clonit S.r.l.)

La rilevazione della presenza di amplificato specifico è stata eseguita mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2% contenente 0,5 μ g/ml di etidio bromuro. Il gel è stato fatto correre a 10 V/cm per circa 90 minuti. Per evidenziare le bande corrispondenti ai vari tipi virali è stato utilizzato un marcatore di pesi molecolari (50 bp DNA step leader) che evidenzia bande da 50 a 800 bp. A fine corsa il gel è stato posto su un transilluminatore a UV (303 nm) e fotografato con filtro UV e pellicola Polaroid.

Sono stati considerati negativi i campioni che contenevano solo la banda a 723 bp.

Sono stati considerati positivi i campioni che contenevano le bande a 325 (HPV16), 520 (HPV31), 227 (HPV33) o 280 bp (HPV35) nell'amplificato con PCR mix-1 «16-35» e le bande a 425 (HPV 18), 340 (HPV39), 475 (HPV45) o 395 bp (HPV395) nell'amplificato con PCR mix-1 «18-59», le bande a 360 (HPV52), 325 (HPV56), 240

(HPV58), 304 bp (HPV66) nell'amplificato con PCR mix-1 «52-66», le bande a 260 (HPV6), 425 bp (HPV11) nell'amplificato con PCR mix-1 «6,11».

Nel caso dell'assenza della banda di 723 bp la seduta non è stata accettata in quanto l'assenza della banda del controllo interno indica la non idoneità del prelievo del campione clinico. La sensibilità e la specificità cliniche dichiarate del test sono rispettivamente del 96.0% e del 95.0%. La sensibilità analitica del test è tale da consentire la rilevazione di circa 200 copie di HPV-DNA/mL.

RISULTATI

Su 446 campioni esaminati, 153 (34.3%) sono risultati positivi al test di ricerca di HPV-DNA eseguito tramite PCR.

L'intervallo di età che ha presentato il più elevato tasso di infezione (38.6%) è risultato quello compreso tra 20 e 30 anni (59 pazienti positive), mentre per le altre fasce d'età la percentuale di risultati positivi era così suddivisa: 27.5% per la fascia 31-35 (42 pazienti positive), 16.3% per quella 36-40 (25 positive), 17.6% per quella >40 (27 positive) (tabella 2).

Tabella 2. Infezione da HPV in rapporto all'età delle pazienti (n=153)

INTERVALLO ETÀ	20-30	31-35	36-40	>40
Numero pazienti	59	42	25	27
Percentuale (%)	38.6	27.5	16.3	17.

Determinando l'età media delle pazienti HPV-positive in rapporto al risultato citologico, è stato riscontrato che le pazienti con citologia normale erano significativamente più giovani (media 30 anni) di quelle classificate HSIL (media 37 anni) (tabella 3).

Tabella 3. Età media delle pazienti HPV-positive in rapporto al risultato citologico

Diagnosi	Normale	LSIL	HSIL
Età media	30	34.5	37

Dai dati forniti dalle pazienti sul numero di partner sessuali è stato possibile notare un significativo decremento con l'aumento dell'età, sovrapponibile all'andamento delle percentuali delle donne riscontrate HPV-DNA positive (figura 1) (4).

Delle 153 donne HPV-positive, 23 (15%) sono risultate infettate con HPV di tipo "a basso rischio" (L.R.), 116 (75.8%) con genotipi ad "alto rischio" (H.R.) e 14 (9%) con entrambi i tipi. È risultato che 130 (85%) pazienti abbiano contratto l'infezione da almeno un vireotipo ad alto rischio.

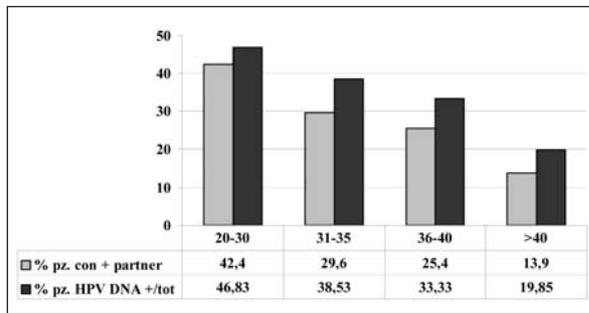


Figura I. Relazione tra pazienti con più partner e pazienti HPV-DNA positive in rapporto alle fasce di età

La prevalenza totale dell'infezione da HPV nel gruppo studiato è stata del 34.3% (153/446) che va da 19.3% (58/301) delle donne con citologia normale all'80.4% (41/51) delle pazienti con HSIL

L'HPV-DNA dei tipi virali "a basso rischio" è stato riscontrato nel 4.7% (14/301) delle donne con indagini citologiche negative, nel 9.6 % (9/94) dei soggetti con citologia LSIL e in nessun caso di HSIL (tabella 4).

I virotipi ad alto rischio sono stati riscontrati nella maggioranza dei casi con un incremento di prevalenza in accordo con la diagnosi citologica, dal 14.6% (44/301) nei casi di citologia negativa all'80.4% (41/51) degli HSIL (figura II).

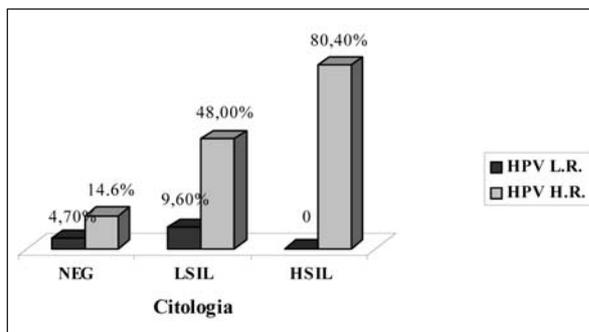


Figura II. Percentuale di HPV L.R. e H.R. in rapporto alla diagnosi citologica

Nelle 116 pazienti risultate positive per HPV ad alto rischio è stato ricercato il virotipo (figura III).

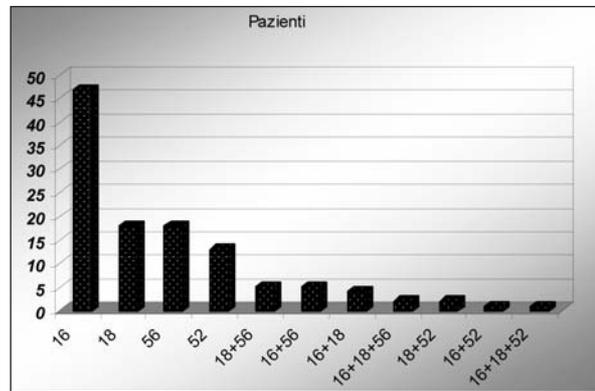


Figura III. Tipizzazione HPV-DNA ad alto rischio

Tale ricerca ha evidenziato la netta prevalenza del virotipo 16 (47/116: 40.5%), seguito dal virotipo 18 (18/116: 15.5%), dal 56 (18/116: 15.5%) e dal 52 (13 su 116: 11.2%). È risultata limitata la contemporanea presenza dei virotipi 18/56, 16/56 (5/116: 4.3%) e 16/18 (4/116: 3.4%). In 6 pazienti (5%) è stata rilevata coinfezione con diversa distribuzione dei virotipi 16/18/52/56 (23).

Nelle pazienti infettate da HPV a basso rischio è stata osservata la presenza del virotipo 6 nel 96% dei casi, mentre nelle pazienti coinfeziate da HPV a basso rischio ed alto rischio il virotipo 6 è sempre stato riscontrato in associazione a 16, 18 e/o 56.

Infine è stata presa in esame la relazione tra i risultati citologici e la ricerca molecolare del virus:

Delle 301 indagini citologiche negative, 58 (19.3%) sono risultate positive per la presenza di HPV-DNA, 39 per HPV HR, 14 per HPV LR e 5 per la contemporanea presenza di sottotipi virali a basso ed alto rischio (figura IV). Nelle 94 pazienti con diagnosi di LSIL è stato riscontrato in 39 (41.5%) l'HPV H.R., in 9 (9.6%) l'HPV L.R., in 6 (6.4%) la contemporanea presenza di HPV H.R. e L.R. ed in 40 (42%) l'HPV non è stato rilevato (figura V).

Nelle 51 pazienti con diagnosi di HSIL in 38 (74.5%) è stato riscontrato HPV ad alto rischio, solo in 3 (6%) HPV a basso rischio in associazione a virotipi ad alto rischio ed in 10 (20%) non è stata rilevata presenza di infezione virale (figura VI).

Tabella 4. Prevalenza dei gruppi di HPV in rapporto con la diagnosi citologica

Citologia	Numero pazienti	Biologia molecolare			Prevalenza(%)
		HPV L.R.	HPV H.R.	Coinfezione	
Negativa	301	14	39	5	19.3
LSIL	94	9	39	6	57.4
HSIL	51	0	38	3	80.4
Totale	446	23	116	14	34.3

HPV L.R. virotipi di HPV a basso rischio: 6, 11

HPV H.R. virotipi di HPV ad alto rischio: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66

Nelle pazienti affette da HSIL è stata osservata una prevalenza del 61% del virotipo 16 isolato o associato ai virotipi 18, 56 e più raramente 52, seguita rispettivamente nel 20% e nel 16% dei casi dal virotipo 18 e 56 (figura VII).

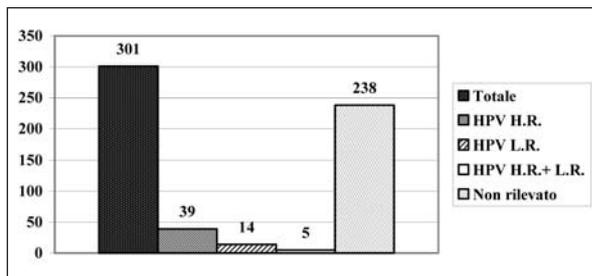


Figura IV. HPV-DNA nelle indagini citologiche negative

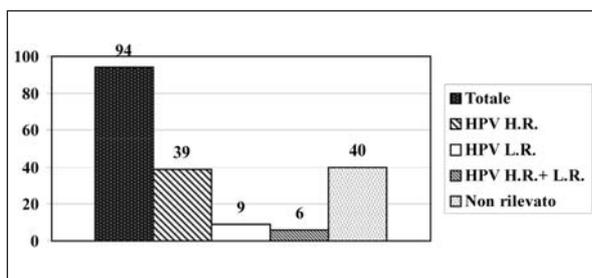


Figura V. HPV-DNA nelle lesioni di basso grado

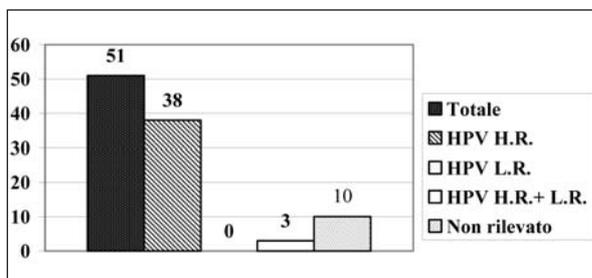


Figura VI. HPV-DNA nelle lesioni di alto grado

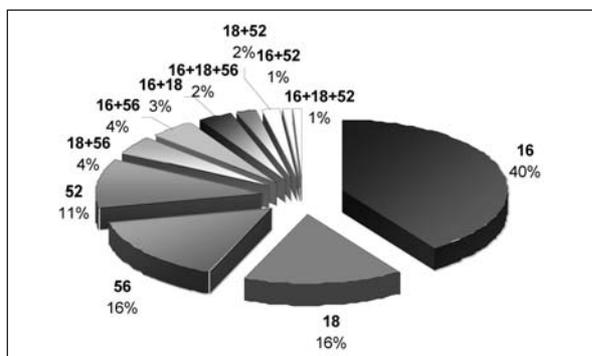


Figura VII. Tipizzazione HPV DNA ad alto rischio

CONCLUSIONI

L'HPV-DNA test è risultato positivo in 153 pazienti con una prevalenza del 34.3% sul totale. Nella fascia di età compresa tra i 20 e i 30 anni è stata rilevata una prevalenza di infezione pari al

39% (dato che avvala la tesi che l'infezione sia associata all'esordio dell'attività sessuale) contro il 16% e 17% delle fasce di età rispettivamente di 36-40 anni e >40 anni, dati in accordo con quanto riportato in letteratura (16, 44) e che confermano che la presenza di HPV-DNA decresce con l'avanzare degli anni. Anche le lesioni cito-istologiche da HPV delle pazienti positive hanno una distribuzione età dipendente, che va da un grado di citologia normale in età giovanile fino a l'HSIL in età più avanzata. Si può quindi notare che l'infezione da HPV ha una maggiore frequenza all'esordio dell'attività sessuale, ma il suo effetto neoplastico procede con il tempo e si manifesta in età più avanzata (4). Un andamento analogo a quello dell'infezione da HPV in rapporto alle fasce di età è stato riscontrato nella relazione tra numero di partner sessuali, uso o meno di contraccettivi di barriera (profilattico) ed età delle donne esaminate. Questo fatto sottolinea che la promiscuità sessuale associata ad un mancato uso di adeguati sistemi di protezione è un fattore di rischio rilevante nella contrazione delle malattie a trasmissione sessuale (MST), compresa quella da HPV, come del resto comunemente riportato in tutti i lavori che trattano la problematica di queste infezioni (16, 24, 44).

Esaminando dal punto di vista cito-istologico i risultati ottenuti, si può osservare una prevalenza di infezioni da HPV ad alto rischio dell'80.4% (41/51) nelle pazienti con diagnosi di HSIL; nelle pazienti affette da LSIL è stata invece riscontrata una prevalenza di infezione di genotipi ad HR pari al 47.8%, dati sovrapponibili a quelli pubblicati nel 2004 e 2005 (18, 25) e una prevalenza di infezione di genotipi LR pari al 16%. Un risultato interessante ed in totale accordo con i dati presenti in letteratura (24, 26, 33) riguarda il 19% delle diagnosi citologiche negative in cui è stata riscontrata la presenza di HPV-DNA. Questa percentuale sottolinea i limiti dello screening primario con il solo Pap test, che come è ampiamente riportato in letteratura sottostima una media dei casi di lesione di circa il 20%. Questa fascia di pazienti considerati citologicamente normali, ma affetti da infezione da HPV potrebbe essere individuata, e quindi opportunamente seguita nel tempo, eseguendo il test di ricerca molecolare del virus in associazione al classico esame citologico. Tale risultato potrebbe essere dovuto ad un errore nella diagnosi citologia, oppure, più verosimilmente a lesioni vaginali o cervicali in apparenti o incipienti. La discordanza di tali dati può essere dovuta al fatto che molte infezioni da papillomavirus possono essere transitorie e scomparire in un tempo variabile da sei mesi a due anni anche se vi è la presenza di genotipi ad alto rischio (3, 5,

17, 44). L'associazione dei due test potrebbe pertanto individuare anche infezioni allo stadio iniziale o tenute sotto controllo dal sistema immunitario, permettendo così in loro monitoraggio per evitare la degenerazione in forme neoplastiche. Inoltre la regolare esecuzione di entrambi i test permetterebbe alle pazienti di posticipare di tre anni il successivo screening cervicale di controllo, con un risparmio dal punto di vista assistenziale e una maggiore tranquillità per le donne che si sottopongono ai controlli preventivi. In una percentuale analoga (19.6%) di HSIL non è stata riscontrata la presenza di HPV-DNA; ciò può essere spiegato con un basso numero di copie del genoma del virus o da una infezione sostenuta da un virotipo non testato oppure dal fatto descritto ampiamente in letteratura che afferma che quanto più la lesione è indifferenziata tanto meno troviamo HPV. Questo dato suggerisce la necessità di un miglioramento della metodica a cui si richiede maggiore sensibilità e specificità per tutti i virotipi del virus.

Per quanto riguarda la distribuzione dei virotipi di HPV nel gruppo di donne preso in esame i risultati ottenuti (prevalenza di isolamento del tipo virale HPV 16 pari al 40.5% e del tipo virale HPV 18 pari al 15.5%) sono in accordo con i risultati della casistica internazionale (16, 30, 31) e nazionale (7, 10, 35, 38). Inoltre il virotipo 16 è risultato presente nell'80% dei casi di HSIL e questo evidenzia così la sua notevole caratteristica neoplastica nonché l'importanza di conoscere, in fase di screening, il tipo di virus da cui è sostenuta l'infezione per poterne valutare in grado di pericolosità futura ed impostare adeguati programmi di vaccinazione preventiva (21, 23, 43).

Il test di biologia molecolare impiegato in questo lavoro è risultato piuttosto indaginoso e più costoso (anche se non di molto) rispetto al test HC-2 raccomandato nelle linee guida americane, ma rispetto al test Digene consente la tipizzazione virale che, alla luce dell'introduzione di vaccini specifici per HPV 16 e HPV 18, sembra essere un dato di importanza fondamentale. Altro dato di grande importanza pare essere la determinazione della carica virale (20, 40), dato non ottenibile con il test utilizzato e ottenibile in forma solo semiquantitativa con il test HC-2, ma che può essere ottenuto in maniera molto precisa con altre metodiche PCR come il DuoPap (Bi-tech) e la PCR Real-Time (13).

In conclusione si può pertanto evidenziare che il test di biologia molecolare utilizzato in questo lavoro per ricercare il DNA di HPV nei campioni in esame, come altri analoghi, in associazione con una scrupolosa indagine citologica può contribuire, almeno in alcuni casi, a migliorare in modo

determinante la diagnosi precoce di cervicocarcinoma.

BIBLIOGRAFIA

1. Arbyn M. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a metaanalysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *JNCI* 2004; 96: 280-93.
2. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
3. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 1: 1-17.
4. Burk RD, Kelly P, Feldman J, et al. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis* 1996; 23(4): 333-41.
5. Callaghan J, Karim S, Mortlock S, et al. Hybrid capture as a means of detecting human papillomavirus DNA from liquid-based cytology specimens: a preliminary evaluation. *Brit J Biomed Sci* 2001; 58: 184-9.
6. Carozzi F, Confortini M, Cecchini S, et al. Triage with HPV testing of subjects with cytologic abnormalities prompting referral to colposcopy assessment. *Cancer* 2005; 105: 2-7.
7. Centurioni MG, Puppo A, Merlo DF, et al. Prevalence of human papillomavirus cervical infection in a italian asymptomatic population. *BMC Infectious Diseases* 2005; 5: 77.
8. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz M, Franceschi S. Human papillomavirus in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 88: 63-73.
9. Cox JT, Schiffman MH, Winzelberg AJ, et al. An evaluation of human papillomavirus testing as part of referral to colposcopy clinics. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 389-95.
10. De Francesco MA, Gargiulo F, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Manca N. Detection and genotyping of Human papillomavirus in cervical samples from Italian patients. *J Med Virol* 2005; 75: 588-92.
11. Della Palma P, Poyer A, Girlando S. HPV triage of women with atypical squamous cells of undetermined significance: a 3 year experience in Italian organized programme. Accettato su *Cytopathology*.
12. Frazer IH, Cox JT, Mayeaux EJ, Franco EL, et al. Advances in prevention of cervical cancer and other Human Papillomavirus-related diseases. *Ped Infect Dis J* 2006; 25: S65-81.
13. Gravitt PE, et al. A comparison between Real-Time Polymerase Chain Reaction and Hybrid Capture 2 for Human Papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 2003; 12(6): 477-84.
14. Gravitt PE, et al. Improved amplification of genital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 357-61.
15. Harper DM, Franco EL, Wheller CM, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of bivalent L1 virus-like particles against human papilloma virus type 16 and 18: follow-up from a randomised trial. *Lancet* 2006; 367: 1247-55.
16. Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-8, Feb 12, 1998.
17. Hoffman MS, Martino MA. 2001 consensus guideli-

- nes for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2004 Sep; 191(3): 1049.
18. Hwang HS, Park M, Lee SY, Kwon KH, Pang MG. Distribution and prevalence of human papillomavirus genotypes in routine pap smears of 2,470 Korean women determined by DNA chip. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004 Dev; 13(12): 2153-6.
 19. IARC working group. Human Papillomaviruses. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol.64. Lyon. International Agency for Research on Cancer; 1995.
 20. Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, et al. Viral load of human papillomavirus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *The Lancet* 2000; 355: 2189-93.
 21. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002 Nov 21; 347(21): 1645-51.
 22. Klaes R, et al. Overexpression of p16 as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92: 276-84.
 23. Lehtinen M, Dillner J. Preventive human papillomavirus vaccination. *Sex Transm Inf* 2002; 78: 4-6.
 24. Lillo F. Papillomavirus umano: un virus nella genesi delle lesioni displastiche e neoplastiche degli epiteli squamosi. *EsaDia*. Anno 5 - n.10, maggio 2002.
 25. Liman AK, Giampaoli EJ, Bonfiglio TA. Should women with atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion, receive reflex human papillomavirus-DNA testing? *Cancer Cytopathology* 2005; 105(6): 457-60.
 26. Liverani CA, Modana G. Infezione genitale da HPV: esami di laboratorio. *La Colposcopia in Italia*; anno XX - n.2 pagg.12-16.
 27. Masciari R, Vasapollo I, Lepore MG, De Grazia R, Rondinelli V, Filia C. La reazione polimerasica a catena (PCR) nella diagnosi delle infezioni genitali da Papillomavirus umano (HPV) *Microbiologia Medica* 2004; 19: 381-5.
 28. Mandelblat JS, et al. Benefits and costs of using HPV testing to screen for cervical cancer. *JAMA* 2002; 287: 2372.
 29. Ministero della Salute. Centro Nazionale per la Prevenzione ed il Controllo delle Malattie (CCM). Piano per lo screening del cancro del seno, della cervice uterina e del colon-retto. Legge n.138 del 26 Maggio 2004 (art.2 bis). Roma, 10 novembre 2004.
 30. Munoz N. Human papillomavirus infection and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19: 1-5.
 31. Munoz N, Bosch FX, De Sanjosè S, et al. Epidemiologic classification of Human Papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
 32. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, De Sanjosè S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004; 111: 278-85.
 33. Nando K, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000; 132: 810.
 34. Reid R, Greenberg MD, Lorincz A, et al. Should cervical cytologic testing be augmented by cervicography or human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection? *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1461-71.
 35. Ronco G, Ghisetti V, Segnan N, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy. *European Journal of Cancer* 41, 297-305.
 36. Ronco G, Voglino G, Volante R, et al. HPV testing in cytologically abnormal women in Italy. 18th International Papillomavirus Conference 2000; 21-28 July Barcellona, Spain.
 37. Ronco G, Voglino GF, Volante R, Carozzi F, Segnan N, Cuzick J. HPV testing in cytologically abnormal women in Italy. Proceedings 18th International Papillomavirus Conference.
 38. Salfa MC, Bocci C, Lillo F, et al. Epidemiologia dell'infezione cervico-vaginale da Human Papillomavirus (HPV) in donne afferenti ad un programma organizzato per la prevenzione del cervico-carcinoma. Abstract accettato alla IX Conferenza Nazionale di Sanità Pubblica. Parma 13-15 ottobre 2005.
 39. Schneider A, Zham DH, Kirchmayr R, et al: Screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3. Validity of cytologic study, cervicography and human papillomavirus detection. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1534-41.
 40. Schlecht FF, Trevisan A, Duarte-Franco E, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2003; 103(4): 519-24.
 41. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
 42. Wallin K, Wiklund F, Angstrom T, et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cancer. *N Engl J Med* 1999; 341: 1633-8.
 43. Welters MJ, et al. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res* 2003 Feb 1; 63(3): 36-41.
 44. Woodman CBJ, Collins S, Winter H, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women; a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001; 357: 1831-6.
 45. Wright TC, Sun XW, Koulos J. Comparison of management algorithms for the evaluation of women with low-grade cytologic abnormalities. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 202-1.
 46. Wright TC, Cox YT, Massad LS, et al. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2003 Jul; 189(1): 295-304.
 47. Wright TC, et al. Adding a test for Human Papillomavirus DNA to cervical cancer screening. *N Engl J Med* 2003; 348: 489.

Mauro Carcheri

Dipartimento di Patologia Clinica

U.O. Laboratorio Analisi

Area Microbiologia e Infettivologia

Azienda Ospedaliera "Villa Scassi"

Ge -Sampierdarena

Corso Onofrio Scassi, 1 - 16149 Genova

Tel.: 010 4102 393; Fax 010 4102 207/288

E-mail: mauro.carcheri@villascassi.it

virologia@villascassi.it