

Prevalence and genotyping of HPV, by cervical brushing, in Irpinia area of Campania region

Pia Carmen Melillo, Maria Landi, Raffaele Ariola, Franca Romeo, Generoso Violano, Elio De Nisco, Anna Todisco

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Unità Operativa Complessa di Virologia, A.O.R.N. "San Giuseppe Moscati", Avellino

Key words: HPV, Genotypes, Prevalence, Cytology, Vaccination

Prevalenza ed identificazione genotipica di HPV, da brushing cervicale, nell'area Irpinia della regione Campania

SUMMARY

Cervical cancer is due to persistent genital infection with Human Papillomavirus (HPV). The purpose of this study was to evaluate prevalence of HPV in Irpinia (Campania region, Italy), distribution of different viral genotypes, correlating cytological results and virological investigations.

In the period 2006-2011, were made 1080 cervical samples of women aged 18-65 years for HPV identification and genotyping. Detection of the virus was performed by Multiplex-PCR System (Seegene, Arrow) and typing with INNO-LiPA HPV Genotyping Extra test (Innogenetics).

Out of the 1080 tested samples, 330 (30.6%) samples were positive for HPV DNA.

The most frequently occurring High Risk (HR)-HPV genotype in single infections was HPV16 (16.6%), followed by HPV51 (10.7%), in multiple infections HPV16 (15.7%) and 31 (14.6%).

The prevalence of infection, correlated with age of patients studied, is greater in the group aged 26-30 years (42.5%).

HR-HPV were detected in different percent in patients with Pap test scores: 22.5% in normal Pap smear (20% HPV16), 14.5% ASCUS (47.6% HPV16), 24% LSIL (20% HPV16), 79.3% HSIL (72.7% HPV16; 9.1% HPV18 detected only in this type of cellular alteration).

The high prevalence of HR-HPV in patients with ASCUS or normal Pap test, suggesting the real advantage of HPV screening test, more sensitive in selecting the actual population at risk.

Based on the findings of our epidemiological study, HR-HPV screening and HPV genotyping test should be strongly advised also to the vaccinated population for the high incidence of genotypes which are not included in vaccines (67%).

INTRODUZIONE

Il carcinoma cervicale è riconducibile all'infezione genitale da persistente Papillomavirus Umano (HPV), che rappresenta la più comune delle infezioni sessualmente trasmesse (3). Più del 50% delle donne sessualmente attive sono esposte, almeno una volta durante la loro vita, all'infezione da HPV (2).

La maggior parte delle infezioni genitali da HPV sono asintomatiche, transienti, e si risolvono spontaneamente senza causare alcuna patologia.

I Papillomavirus genitali sono stati classificati in alto rischio e basso rischio, riflettendo il loro potenziale rischio di causare lesioni maligne.

HPV a basso rischio causano un'alta percentuale di displasie cervicali di basso grado, più del 90% dei condilomi genitali e non risultano associati al cancro cervicale (8).

Al contrario, un'infezione persistente della cervice uterina da parte di specifici genotipi HPV ad

alto rischio rappresenta un prerequisito per lo sviluppo di una neoplasia cervicale intraepiteliale e del cancro della cervice uterina, (4, 5, 9) che rappresenta la principale neoplasia causa di morte tra le donne nei paesi in via di sviluppo (1).

Attualmente, la prevenzione viene eseguita mediante Pap Test nelle pazienti tra 25 e 65 anni, mentre il *test* HPV è raccomandato come *triage* nelle citologie dubbie (ASCUS).

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare la prevalenza dell'infezione HPV nell'area Irpinia, la diffusione dei differenti genotipi virali e correlare i risultati citologici con le indagini virologiche.

METODI

Nel periodo ottobre 2006 - maggio 2011, sono stati eseguiti 1080 prelievi cervico-vaginali di donne di età compresa tra 18 e 65 anni, monitorizzate dal Reparto di Ginecologia in seguito al

Corresponding author: Anna Todisco

U.O.C. Virologia, A.O.R.N. "S.G. Moscati"

Contrada Amoretta, 83100 - Avellino - Tel./Fax: 0825 203659

E-mail: antodisco@aosgmoscati.av.it

riscontro di lesioni CIN1 (25) o a terapia medica, laserterapia o conizzazione per trattamento di lesioni CIN2 (3) o CIN3 (2), o afferite presso il Laboratorio di Virologia per l'identificazione e la genotipizzazione di HPV in seguito a Pap Test anomalo (604 ASCUS; 188 LSIL; 58 HSIL) o con Pap Test nella norma (200).

La ricerca del virus è stata eseguita mediante Multiplex-PCR System (Seegene "HPV 4 ACE Screening", Arrow) che si avvale della tecnologia "Dual Priming Oligonucleotide (DPO primers)" per amplificare, tramite PCR, il target di DNA virale, successivamente rilevato attraverso elettroforesi capillare su gel di agarosio (ScreenTape system).

La genotipizzazione del virus è stata effettuata con test INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics) che permette l'identificazione di 28 diversi genotipi del virus del Papilloma umano (HR-HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82; HPV LR: 6, 11, 40, 43, 44, 54, 70; HPV pHR: 26, 53, 66; altri genotipi: 69, 71, 74).

Nelle infezioni singole i genotipi HR maggiormente circolanti nell'area Irpina sono stati HPV16 (16.7%), HPV51 (10.7%); nelle infezioni multiple HPV16 (15.7%) e 31 (14.6%) sono i più diffusi (Figura II).

La prevalenza dell'infezione HR-HPV, correlata con l'età delle pazienti studiate, è risultata maggiore nella fascia 26-30 anni (42.5%) (Figura III). La correlazione tra citologia cervicale e genotipi ha rilevato HR-HPV nel 22.5% dei Pap test nella norma (20% HPV16); 14.5% di ASCUS (47.6% HPV16); 24% di LSIL (20% HPV16) e 79.3% di HSIL (72.7% HPV16; 9.1% HPV18 rilevato solo in questo tipo di lesione preneoplastica) (Figura IV). Inoltre, HR-HPV sono stati rilevati nel 44% di CIN1 (14% HPV16), i 3 campioni CIN2 sono risultati positivi a HPV18 e i 2 CIN3 a HPV16.

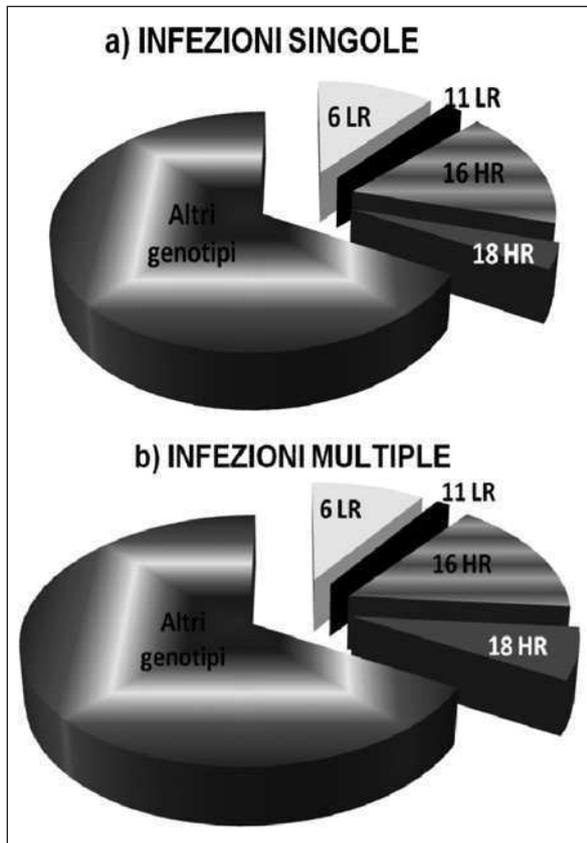


Figura I. Prevalenza dei genotipi, contro cui sono diretti i vaccini, nelle infezioni singole (a) e nelle infezioni multiple (b).

RISULTATI

HPV DNA è stato rilevato in 330/1080 campioni (30.6%); 252 genotipi rilevati nelle infezioni singo-

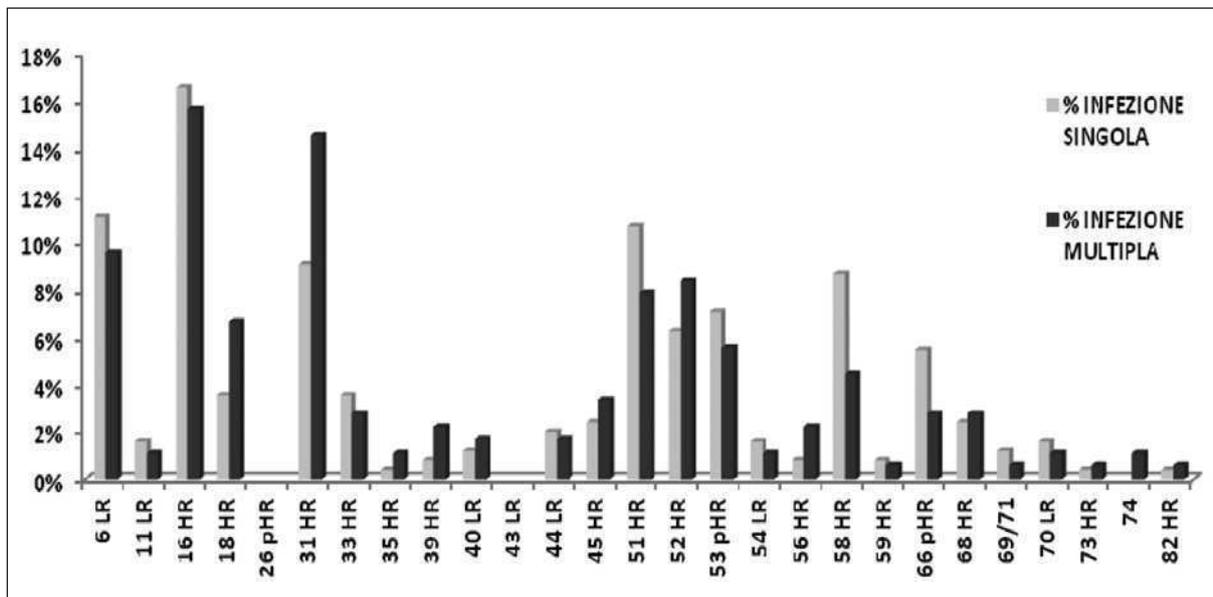


Figura II. Prevalenza di genotipi virali, nell'area Irpina, in infezioni singole e multiple.

le (58.6%), 178 (41.4%) in 78 infezioni multiple. I genotipi ad alto rischio oncogeno HPV16 e HPV18, contro cui sono diretti i vaccini in commercio (Gardasil e Cervarix), sono stati rilevati nel 16.7% delle infezioni singole (Figura Ia) e 15.7% delle infezioni multiple, per quanto riguarda HPV16; nel 3.6% delle infezioni singole (Figura Ia) e 6.7% delle infezioni multiple (Figura Ib), per HPV18. I genotipi HPV6 e 11, “basso rischio”, contro cui è diretto il vaccino quadrivalente (Gardasil), sono stati evidenziati nel 12.7% delle infezioni singole (Figura Ia) e 10.7% delle infezioni multiple (Figura Ib).

CONCLUSIONI

La percentuale di positività di HPV-DNA ad alto rischio oncogeno cresce nei tre gruppi citologici, passando da 14.5% per ASCUS al 24% per L-SIL e 79.3% per H-SIL, mentre si osserva un’alta percentuale di positività (22.5%) nei Pap Test nella norma.

L’alta prevalenza di HR-HPV in pazienti con Pap Test nella norma e ASCUS, suggerisce l’importanza del test HR-HPV, più sensibile nel selezionare la reale popolazione a rischio (6, 7).

L’elevato numero di genotipi HR riscontrati e la disponibilità di vaccini diretti contro specifici genotipi HPV (HPV16; HPV18; HPV6; HPV11),

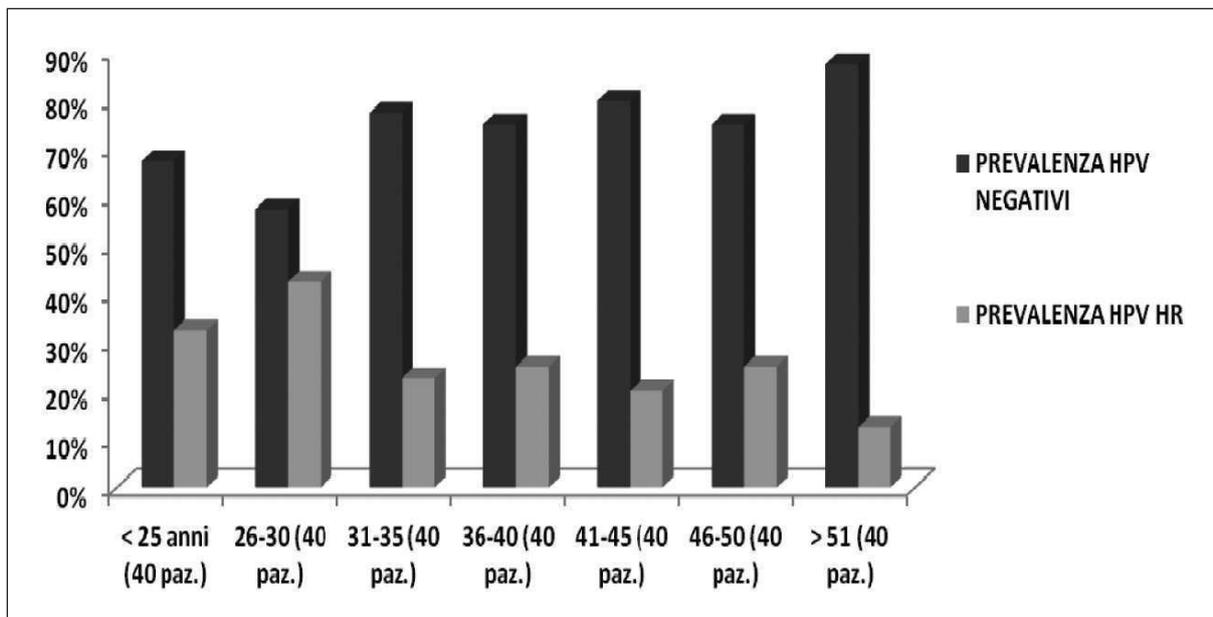


Figura III. Prevalenza HR-HPV per fasce di età.

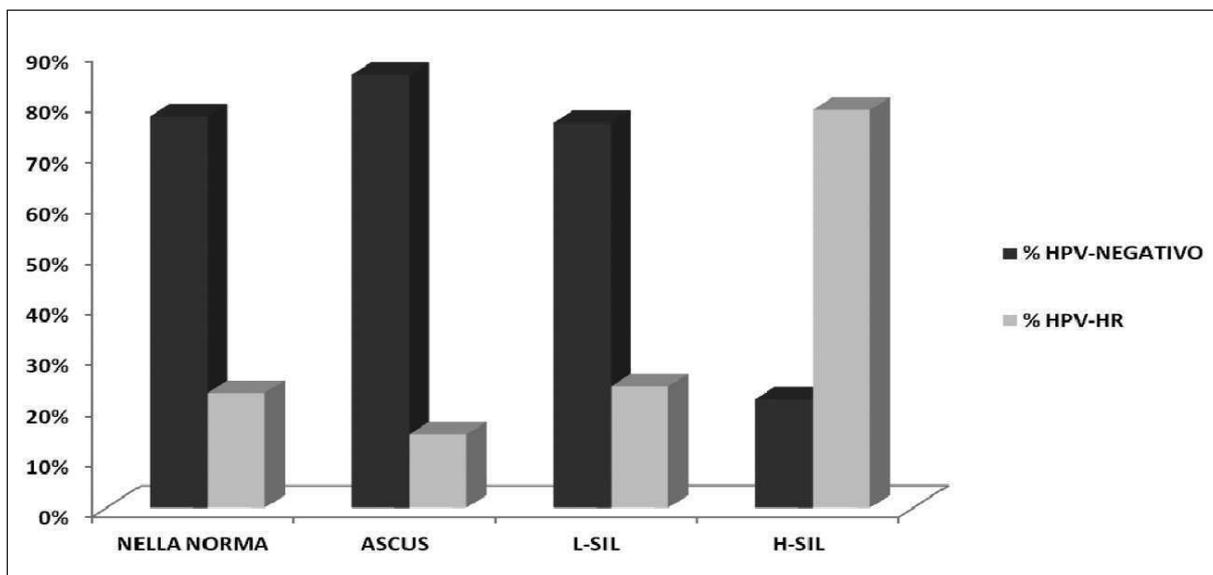


Figura IV. Correlazione tra Test HR-HPV e Pap Test.

sottolinea l'importanza, nell'ambito della prevenzione primaria, di maggiori dati sui virotipi circolanti, mediante l'utilizzo di *test* per la ricerca di HR-HPV affiancati da *test* di genotipizzazione.

Lo screening della popolazione Irpina ha confermato l'ampia circolazione del genotipo HPV16 (16.3%), ma il 67% dei genotipi isolati sia nelle infezioni singole che multiple non sono compresi nei vaccini attualmente disponibili.

Sulla base dei dati emersi nel nostro studio epidemiologico, il *test* virologico andrebbe consigliato anche alla popolazione sottoposta alla vaccinazione, che risulta scarsamente "protetta" dai genotipi HR circolanti e non presenti nel vaccino; è in definitiva auspicabile, secondo la nostra opinione, una migliore coordinazione tra programma vaccinale e *test* molecolare HPV.

BIBLIOGRAFIA

1. Anorlu RI. Cervical cancer: the sub-Saharan African perspective. *Reprod Health Matters*. 2008; 16 (32): 41-9.
2. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005; 32 (Suppl 1): S16-S24.
3. Cates W Jr. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States: American Social Health Association Panel. *Sex Transm Dis*. 1999; 26 (4 Suppl): S2-S7.
4. Moscicki A, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3: S42-S51.
5. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348: 518-27.
6. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, et al. New Technologies for Cervical Cancer screening (NTCC) Working Group. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2010 Mar; 11 (3): 249-57.
7. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011; Mar 2; 103 (5): 368-83.
8. Trottier H, Franco EL. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Manag Care*. 2006; 12 (suppl 17): S462-72.
9. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999; 189: 12-9.