

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**Scienze Mediche generali e Scienze dei servizi: Progetto n. 1:
“Medicina Materno Infantile e dell'Età Evolutiva e
Fisiopatologia dello Sviluppo Sessuale”**

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/H1

Settore Scientifico disciplinare: MED/40

**Valutazione dell'impiego dei test per la genotipizzazione di HPV e
l'espressione degli oncogeni virali nel follow-up di donne conizzate per
lesioni cervicali di alto grado nello screening del cervico-carcinoma
della Regione Emilia-Romagna**

Presentata da: Dott.ssa Elena Marra

Coordinatore Dottorato

Prof. Nicola Rizzo

Relatore

Dott.ssa Maria Cristina Meriggiola

Esame finale anno 2013

A mio marito Massimiliano
A mamma, papà e a mio fratello Alessandro

Ringrazio il Dott. Silvano Costa e la Dott.ssa Simona Venturoli per avermi coinvolta nei loro interessanti e innovativi progetti di ricerca, consentendomi di elaborare questa tesi, per i preziosi insegnamenti che mi hanno dato nel corso di questi anni di formazione e per la disponibilità dimostratami in qualunque momento io abbia avuto bisogno del loro supporto scientifico e umano.

Desidero, inoltre, ringraziare il Prof. Nicola Rizzo e il Prof. Luigi Bolondi, Coordinatori del mio corso di Dottorato, il Prof. Giuseppe Pelusi e la Dott.ssa Maria Cristina Meriggiola, miei Tutor in questi anni, per il loro contributo al mio percorso formativo.

INDICE

VALUTAZIONE DELL'IMPIEGO DEI TEST PER LA GENOTIPIZZAZIONE DI HPV E L'ESPRESSIONE DEGLI ONCOGENI VIRALI NEL FOLLOW-UP DI DONNE CONIZZATE PER LESIONI CERVICALI DI ALTO GRADO NELLO SCREENING DEL CERVICO-CARCINOMA DELLA REGIONE EMILIA-ROMAGNA

Capitolo 1

1.1 Introduzione.....	6
1.2 Infezione da HPV: epidemiologia.....	6
1.3 Ruolo carcinogenetico.....	8
1.4 I precursori del carcinoma cervicale: definizione e classificazione.....	9
1.5 Infezione da HPV: storia naturale e oncogenesi cervicale.....	12
<i>1.5.1 Cenni virologici.....</i>	<i>12</i>
<i>1.5.2 Ciclo di replicazione virale.....</i>	<i>14</i>
<i>1.5.3 Infezione transitoria e persistente.....</i>	<i>17</i>
<i>1.5.4 Acquisizione, clearance e persistenza di HPV.....</i>	<i>19</i>
1.6 Storia naturale delle lesioni cervicali e carcinogenesi.....	31

Capitolo 2

2.1 Introduzione.....	38
2.2 Pap test e tecnologie molecolari emergenti a confronto.....	39
2.3 Cenni di tecniche molecolari virologiche.....	41

2.3.1 Metodi per la diagnosi di infezione da HPV.....	41
2.3.2 Metodi per la determinazione della carica virale.....	43
2.3.3 Metodi per la valutazione dell'integrazione virale.....	43
2.3.4 Tecniche per l'analisi degli RNA messaggeri E6 ed E7.....	44
2.4 HPV DNA test e HPV mRNA test a confronto.....	45
2.5 Follow-up post trattamento conservativo (escissionale) di neoplasia intraepiteliale cervicale.....	57

Capitolo 3

Studio sperimentale

3.1 Introduzione.....	64
3.2 Obiettivi dello studio.....	67
3.3 Materiali e Metodi.....	67
3.4 Risultati preliminari.....	71
3.5 Conclusioni.....	76

Bibliografia.....	78
--------------------------	-----------

**VALUTAZIONE DELL'IMPIEGO DEI TEST PER LA
GENOTIPIZZAZIONE DI HPV E L'ESPRESSIONE DEGLI
ONCOGENI VIRALI NEL FOLLOW-UP DI DONNE CONIZZATE
PER LESIONI CERVICALI DI ALTO GRADO NELLO
SCREENING DEL CERVICO-CARCINOMA DELLA REGIONE
EMILIA-ROMAGNA**

Capitolo 1

1.1 Introduzione

È ormai ampiamente riconosciuto il ruolo carcinogenetico dello *Human Papilloma Virus* (HPV), identificato come fattore necessario, anche se non sufficiente, per lo sviluppo del cancro cervicale, il secondo tumore più comune che colpisce le donne nel mondo. Il DNA virale è individuato, infatti, in oltre il 99.7% dei casi di carcinoma cervicale [1-6].

1.2 Infezione da HPV: epidemiologia

Gli HPV sono virus ubiquitari che mostrano uno spiccato tropismo per i tessuti epiteliali cutanei e mucosi. Degli oltre 100 genotipi conosciuti, più di 40 possono infettare la mucosa genitale [7]. L'infezione da HPV è una delle più frequenti infezioni trasmesse sessualmente, che coinvolge comunemente le adolescenti e le donne giovani dopo l'inizio dell'attività sessuale. Il CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) ha stimato che ogni anno negli USA si registrano quasi 20 milioni di nuove infezioni sessualmente trasmesse, di cui circa il 50% coinvolge i giovani di età

compresa tra 15 e 24 anni, sebbene essi rappresentino solo il 25% della popolazione sessualmente attiva. In particolare, l'infezione da HPV è risultata la più frequente con 14.1 milioni di nuovi casi annui, di cui quasi la metà in quella fascia d'età [8] (Fig. 1) [9, 10].

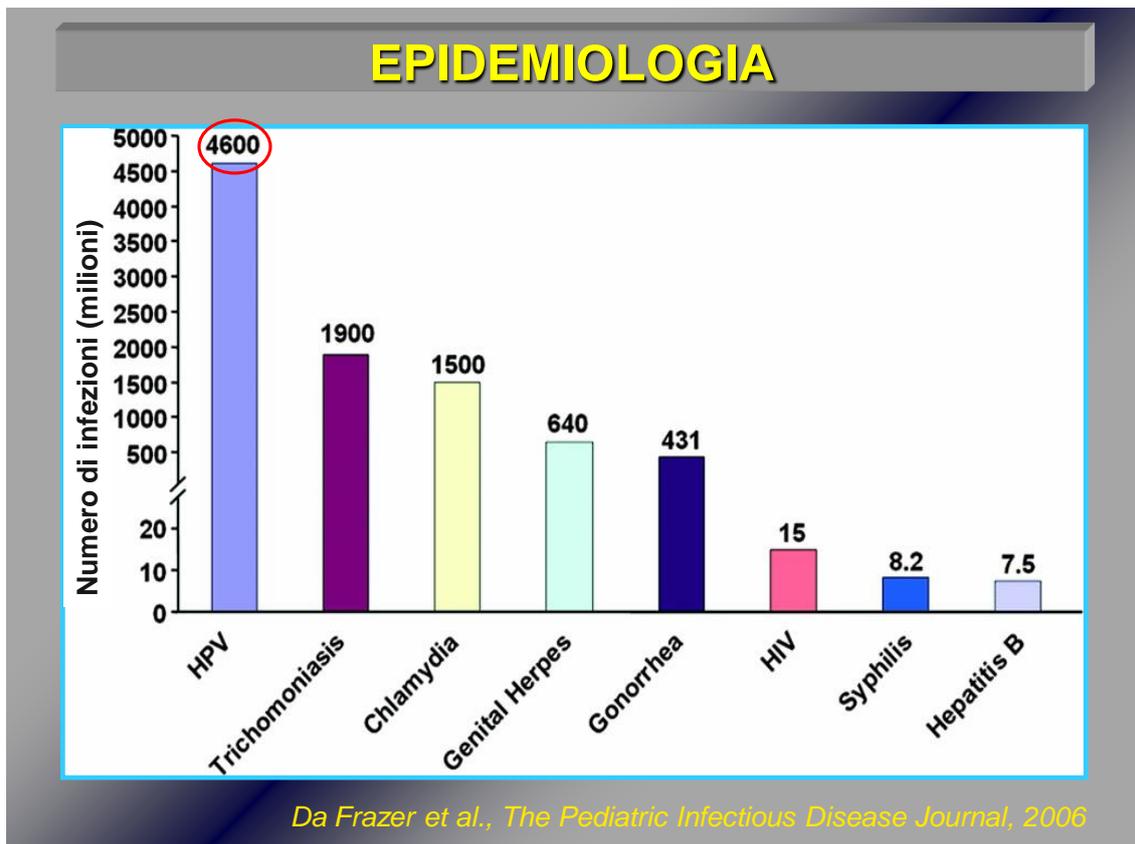
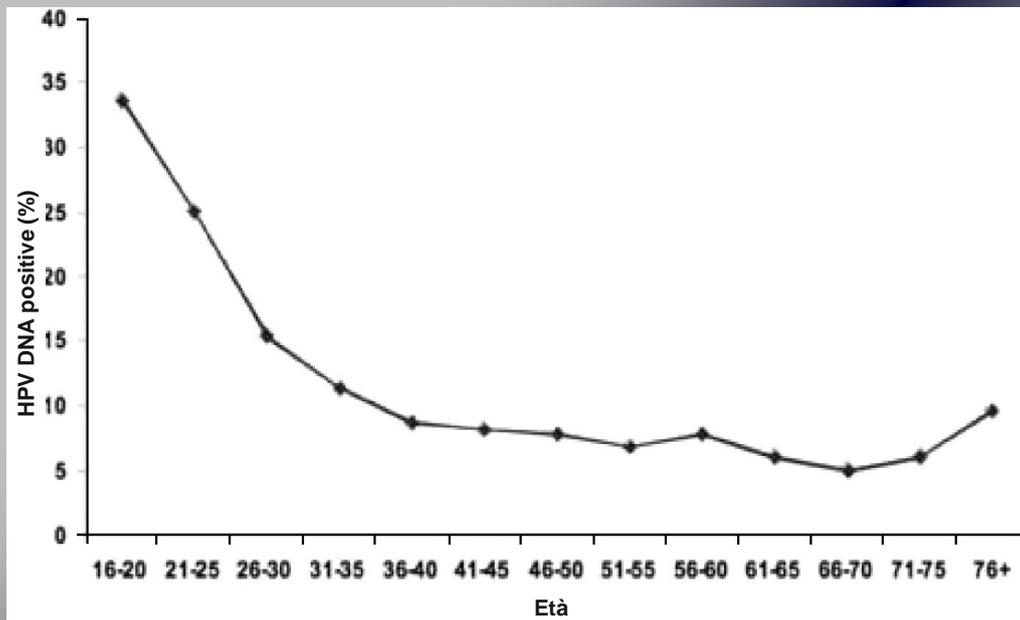


Figura 1. Incidenza annuale delle più comuni infezioni sessualmente trasmesse in giovani Americani di 15-24 anni d'età nel corso del 2000 [9,10].

La maggiore prevalenza dell'infezione da HPV nelle giovani donne sessualmente attive di età ≤ 25 anni è ampiamente documentata in letteratura (Fig. 2) [9, 11-16].

PREVALENZA ETÀ-SPECIFICA DI HPV



Da Frazer et al., *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2006

Figura 2. Prevalenza delle infezioni da HPV (HR) correlata all'età in giovani donne [9, 11].

1.3 Ruolo carcinogenetico

La relazione causale tra l'HPV e il carcinoma invasivo della cervice è largamente riconosciuta e validata da numerosi studi. Tuttavia, la maggior parte dei Papillomavirus che infettano l'uomo non sono correlati a tumori. Degli oltre 40 genotipi che possono infettare le aree muco-cutanee anogenitali, alcuni sono classificati a basso (*Low Risk*, LR-HPV) altri ad alto (*High Risk*, HR-HPV) rischio oncogeno, in base al potenziale carcinogenetico. I primi sono responsabili di lesioni benigne, come i condilomi genitali, che raramente progrediscono verso la malignità. Gli HR-HPV sono responsabili della maggior parte delle lesioni di alto grado e di oltre il 99.7% dei carcinomi. L'HPV16 da solo è responsabile di oltre il 50% dei tumori invasivi; l'HPV16, l'HPV18 e la coinfezione HPV16/18

complessivamente sono responsabili di oltre il 70% dei tumori invasivi e delle lesioni precancerose di tipo squamoso [17]. L'HPV18 sembra invece essere il principale genotipo correlato alle lesioni ghiandolari, che costituiscono il 15% delle lesioni cervicali premaligne e maligne [18]. Oltre agli HPV16 e 18, altri genotipi considerati ad alto rischio oncogeno sono gli HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, e 82, mentre i tipi 26, 53, e 66 dovrebbero essere considerati probabilmente oncogeni. I tipi a basso rischio sono l'HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108 (Tab. 1) [1, 17].

	HPV Types	Manifestations
High risk	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82	Low grade genital lesions High grade genital lesions Cervical cancer Other anogenital cancers
Low risk	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108	Low grade genital lesions Condylomata acuminata (genital warts) Recurrent respiratory papillomatosis

Tabella 1. Classificazione dei tipi di HPV con le possibili lesioni ad essi correlati. (da Frazer et al., 2006) [1, 9, 17].

1.4 I precursori del carcinoma cervicale: definizione e classificazione

Come è noto, il carcinoma cervicale è preceduto da una fase pretumorale o preinvasiva più o meno lunga, che può essere individuata mediante l'esame citologico delle cellule cervicali esfoliate e confermata mediante l'esame istologico di tessuto cervicale. Il modello oncogenetico, secondo cui il cervicocarcinoma si sviluppa progressivamente attraverso varie lesioni intraepiteliali definite "precursori", si basa su precise relazioni di ordine temporale, spaziale, morfologico, clinico e biologico tra i precursori stessi e

il carcinoma. Le lesioni preinvasive, infatti, precedono lo sviluppo della neoplasia invasiva, sono adiacenti ad essa, presentano analogie citologiche, gli stessi fattori di rischio, e hanno un progressivo potenziale invasivo [19, 20].

Le lesioni istologiche cervicali preinvasive sono definite Neoplasie Cervicali Intraepiteliali (CIN), che, in base allo spessore epiteliale interessato dalla atipie cellulari, sono suddivise in 3 gradi: CIN1 o displasia lieve (coinvolgimento del terzo inferiore dell'epitelio, con strati superficiali regolari), CIN2 o displasia moderata (coinvolgimento dei 2/3 inferiori dello spessore epiteliale), e CIN3, comprendente la displasia severa e il carcinoma in situ (CIS) (distribuzione a tutto spessore delle atipie cellulari). Sulla base delle maggiori conoscenze acquisite sulla storia naturale della neoplasia, le CIN possono essere distinte in CIN1 da un lato e CIN2-3 dall'altro, secondo un modello dualistico basato sulle diverse potenzialità evolutive delle lesioni cervicali in senso tumorale [20].

Il sistema di refertazione e classificazione della citologia cervicale attualmente in uso è il Sistema Bethesda del 2001, che distingue analogamente le Lesioni Squamose Intraepiteliali (SIL) in basso (*Low-SIL*, LSIL) e alto (*High-SIL*, HSIL) grado. Le prime, che comprendono anche le atipie coilocitiche (modificazioni cellulari HPV correlate), regrediscono nella maggior parte dei casi, mentre le SIL di alto grado presentano un alto potenziale evolutivo verso il carcinoma invasivo, inversamente correlato alla possibilità di regressione. Un'altra categoria citologica è definita ASC (*Atypical Squamous Cells*), che indica la presenza di cellule squamose atipiche di significato incerto, indeterminato (ASC-US) o tali per cui non si può escludere una lesione di alto grado (HSIL) (Tab. 2).

Sistema Bethesda 2001: Terminologia usata per la classificazione delle anomalie citologiche al Pap test

Anormalità delle cellule epiteliali

Cellule Squamose

- *Cellule squamose atipiche (ASC)*
- *ASC di significato indeterminato (ASC-US)*
- *ASC, che non può escludere lesioni squamose intraepiteliali di alto grado (ASC-H)*
- *Lesione squamosa intraepiteliale di basso grado (LSIL) (comprendente: infezione da HPV o coilocitosi, displasia lieve/neoplasia cervicale intraepiteliale di grado 1 - CIN1)*
- *Lesione squamosa intraepiteliale di alto grado (HSIL) (comprendente: displasia moderata e severa/neoplasia cervicale intraepiteliale di grado 2 e 3- CIN2 e CIN3, carcinoma in situ - CIS)*
- *Carcinoma squamocellulare*

Cellule ghiandolari

- *Cellule ghiandolari atipiche (AGC) (specificare se endocervicali, endometriali o non specificabili)*
- *Cellule ghiandolari atipiche suggestive di neoplasia (specificare se endocervicali, endometriali o non specificabili)*
- *Adenocarcinoma endocervicale in situ (AIS)*
- *Adenocarcinoma: endocervicale, endometriale, extrauterino, non specificabile*

Altro

- *Cellule endometriali in donne di età ≥ 40 anni*

Tabella 2. Sistema Bethesda 2001: terminologia usata per la classificazione delle anomalie citologiche al Pap test [21].

Confrontando le categorie diagnostiche citologiche e istopatologiche, le lesioni LSIL corrispondono alla displasia lieve o CIN1, e le lesioni di alto grado (HSIL) alla displasia moderata/severa (CIN2-3) e al carcinoma in situ (CIS). Le categorie colposcopiche corrispondenti sono la Zona di Trasformazione Anormale di grado 1 (AnTZ G1) e quella di grado 2 (AnTZ G2), rispettivamente. Tale modello dualistico/binario ha avuto significative ripercussioni terapeutiche, limitando i trattamenti alle lesioni di alto grado ed evitando quelli inutili.

1.5 Infezione da HPV: storia naturale e oncogenesi cervicale

1.5.1 Cenni virologici

I Papillomavirus sono piccoli virus specie-specifici privi di envelope glicoproteico, con DNA circolare a doppia elica, che presentano spiccato tropismo mucoso genitale o cutaneo. Come è già stato ribadito, alcuni tipi di HPV possono causare diverse patologie benigne del tratto genitale, quali lesioni iperproliferative e condilomi genitali, altri invece sono riconosciuti come carcinogeni/agenti causali, necessari nel processo di trasformazione neoplastica degli epitelii squamosi anogenitali.

Il genoma dell'HPV è costituito da geni espressi precocemente nel loro ciclo vitale (*Early*, E), coinvolti nei processi di regolazione del ciclo replicativo virale, e da geni tardivi (*Late*, L), che codificano per le proteine strutturali del capsido (L1 ed L2). Tra i geni precoci, E1, E2 ed E8 sono coinvolti nella replicazione del DNA virale, nel mantenimento dello stato episomiale, nella regolazione della trascrizione e nella sintesi di DNA "binding proteins"; E4 è coinvolta nella maturazione della particella virale; E5, E6 ed E7 sono coinvolti nei processi di controllo del numero di copie del DNA episomiale e di trasformazione e immortalizzazione cellulare

[20]. Il ciclo produttivo dell'HPV è legato alla differenziazione epiteliale. Quando penetra nelle cellule basali dell'epitelio squamoso, il virus perde l'involucro proteico e il genoma virale si introduce nel nucleo della cellula dove rimane in forma episomiale, esprimendo solo alcuni geni (E1 ed e2), replicandosi insieme ai cromosomi cellulari, quindi una volta sola per ogni ciclo cellulare, tramite il macchinario riproduttivo della cellula ospite. In seguito alla divisione cellulare, le cellule figlie dallo strato basale migrano verso gli strati superficiali e vanno incontro a differenziazione. La formazione delle nuove particelle virali viene completata negli strati epiteliali più superficiali, dove vengono espressi i geni tardivi e da cui possono essere rilasciate insieme alle cellule desquamate (Fig. 4) [9, 22, 23].

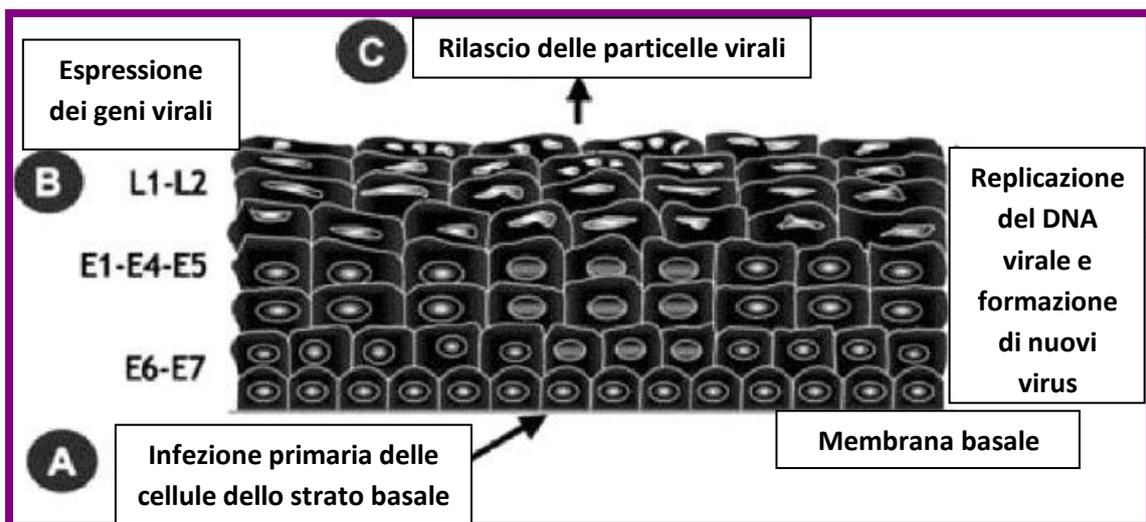


Figura 4. Ciclo replicativo virale nella mucosa epiteliale: A) l'HPV infetta le cellule dello strato basale; B) il virus usa il macchinario replicativo della cellula ospite per replicare il proprio DNA e sintetizzare le proteine codificate dai geni virali; C) le particelle virali neoformate vengono rilasciate [9, 22].

Quando il genoma virale si integra in quello cellulare, i prodotti di E6 ed E7 vengono sintetizzati in eccesso tanto da legare e inattivare le proteine cellulari anti-oncogene p53 e pRB, rispettivamente. Più precisamente, la

proteina codificata da E6 inibisce le funzioni di p53, quali l'arresto della cellula in fase G1, la riparazione del DNA danneggiato e l'induzione di apoptosi, agendo anche sulla lunghezza dei telomeri. La proteina codificata da E7, legandosi a pRB ne distrugge il legame con E2F-1, fattore di trascrizione cellulare che, una volta liberato, induce la trascrizione di geni che codificano per proteine che attivano la fase S del ciclo cellulare. Ne conseguono una proliferazione deregolata e una ritardata maturazione cellulare che, unitamente all'inibizione dell'apoptosi, contribuiscono alla replicazione continua e incontrollata delle cellule infette e modificate. Dunque, l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite e l'aumentata espressione dei geni E6 ed E7 sono considerate condizioni fondamentali per l'induzione e il mantenimento della trasformazione cellulare. Pertanto, come suggerito dagli studi più recenti, l'individuazione dell'RNA messaggero (mRNA) di E6 ed E7 potrebbe diventare un marcatore indiretto dell'integrazione e dell'attivazione degli oncogeni virali, indicativo dell'evolutivezza della lesione [20].

1.5.2 Ciclo di replicazione virale

Il ciclo vitale dell'HPV dipende dalla replicazione attiva e dalla divisione della cellula ospite. Dal momento che le cellule epiteliali squamose degli strati superficiali sono già differenziate e non si dividono più, l'HPV necessita delle cellule epiteliali indifferenziate dello strato basale per iniziare un ciclo riproduttivo. Dunque, il virus penetra nelle cellule basali verosimilmente attraverso gli strati epiteliali naturalmente sottili come quelli della Zona di Trasformazione (ZT) della cervice, o attraverso microabrasioni prodotte nell'epitelio durante l'attività sessuale. La zona di trasformazione, infatti, risulta essere l'area in cui hanno origine più frequentemente le lesioni pretumorali e il cervicocarcinoma, in quanto a partire dall'adolescenza l'epitelio ghiandolare in quell'area va incontro a un

processo fisiologico di metaplasia in epitelio squamoso, caratterizzato dalla replicazione e dalla differenziazione cellulare. Questo spiega l'elevata incidenza dell'infezione da HPV nelle giovani donne dopo l'inizio dell'attività sessuale [18]. Le cellule basali dell'epitelio squamoso e le cellule metaplastiche della ZT rappresentano i principali bersagli dell'HPV, che può comunque infettare anche le cellule epiteliali ghiandolari dell'endocervice. La maggior parte delle lesioni premaligne e maligne sono di tipo squamoso e sono provocate dagli HPV16 e/o 18, mentre nel 15% dei casi le lesioni sono di tipo ghiandolare (adenocarcinoma in situ e adenocarcinoma invasivo), in cui è coinvolto principalmente il tipo HPV 18 [18, 23].

Cenni di anatomia e di dinamica degli epiteli cervicali

Ectopia-ectropion

Per ectopia ghiandolare si intende la presenza di epitelio cilindrico sull'esocervice, in genere in maniera simmetrica sul labbro anteriore e sul labbro posteriore. L'epitelio cilindrico è un epitelio colonnare monostratificato che riveste una serie di plicature e papille della lamina propria, più piccole e più omogenee delle estroflessioni grossolane e accentuate dell'arbor vitae del canale cervicale, in cui il tessuto connettivo si articola in solchi profondi. L'ectropion è un'eversione del canale cervicale che può interessare solo un labbro dell'esocervice, ed è caratterizzato da plicature più grossolane della lamina propria che gli conferiscono un aspetto mammellonato e pseudopolipoide.

Giunzione squamo-colonnare

La Giunzione Squamo-Colonnare (GSC) è il confine tra l'epitelio squamoso e quello colonnare, ed è caratterizzato da una notevole variabilità topografica in quanto va incontro a numerose dislocazioni in base all'età e a diversi fattori, quali lo status ormonale estrogenico, le gravidanze e i parti.

Zona di trasformazione

La zona o area di trasformazione cervicale (ZT) è la zona in cui avvengono i processi di trasformazione dell'epitelio cilindrico in epitelio squamoso pluristratificato (metaplasia squamosa). Ciò avviene tramite due meccanismi indipendenti ma non esclusivi, la

sostituzione epiteliale e la metaplasia squamosa propriamente detta. Il primo processo origina dall'epitelio squamoso nativo periferico che si dirige in maniera centripeta verso l'epitelio cilindrico, dunque verso l'orifizio uterino esterno (OUE). La metaplasia squamosa propriamente detta origina nell'area di ectopia stessa e si dirige sia in senso centripeto verso l'OUE che in senso centrifugo, verso l'epitelio squamoso nativo. Ciò avviene mediante la proliferazione e la graduale maturazione in senso squamoso di cellule di riserva o sottocilindriche (cellule di Fluman), cellule indifferenziate localizzate sotto le cellule colonnari mucipare generalmente poco rappresentate. La ZT è compresa tra la GSC originaria (limite periferico), tra l'epitelio squamoso nativo e l'epitelio squamoso di trasformazione, e la nuova GSC (limite prossimale), tra l'epitelio cilindrico e quello squamoso neoformato.

L'epitelio metaplastico, ancora immaturo e indifferenziato, può essere particolarmente vulnerabile a stimoli mutageni, come l'HPV, che, modificandone l'assetto genomico, può portare alla proliferazione di cloni cellulari anormali, dando luogo a focolai eso- ed endo-cervicali di displasia. Nella fase iniziale dell'infezione, in cui il virus colonizza le cellule basali dell'epitelio squamoso, le cellule di riserva subcolonnari (*cellule di Fluman*) e le cellule metaplastiche della ZT in attiva proliferazione, il genoma virale va incontro ad una replicazione in forma episomiale, vale a dire come DNA circolare extracromosomico e non integrato nel genoma cellulare. Nella fase latente dell'infezione, il virione è contenuto nei nuclei delle cellule squamose basali in poche copie o anche in forma inattiva. Nell'infezione produttiva il virus si moltiplica, utilizzando l'apparato replicativo della cellula ospite per riprodurre il proprio materiale genetico e per esprimere le proprie proteine, e si diffonde fino agli strati superficiali dell'epitelio, seguendone la differenziazione squamosa. Quando il genoma virale si integra in quello della cellula ospite, il virus non si replica e scompare come entità autonoma, e si ha invece una moltiplicazione monoclonale delle cellule ospiti. Ciò comporta la

trascrizione di proteine oncogene virali che stimolano la proliferazione continua e aberrante delle cellule squamose cervicali, ne inibiscono la differenziazione e la maturazione, fino a trasformarle in senso tumorale [20]. Come spiegato precedentemente, E6 ed E7 sono gli oncogeni virali la cui espressione correla con il grado della lesione. Nelle lesioni di basso grado, infatti, il DNA virale è in forma episomiale e i due oncogeni sono espressi a bassi livelli; nelle lesioni di alto grado il DNA virale è più frequentemente integrato nei cromosomi della cellula ospite, le proteine codificate da E6/E7 sono prodotte ad alti livelli, con aumento della replicazione cellulare e sviluppo di lesioni displastiche intraepiteliali che, in casi estremi, possono superare la membrana basale (trasformazione maligna) [15].

1.5.3 Infezione transitoria e persistente

Come riportato ampiamente in letteratura, circa l'80% delle donne affette presenta un'infezione *transitoria* da HPV, che regredisce spontaneamente entro 18-24 mesi, in particolare nelle donne più giovani. Nel restante 20% dei casi l'infezione può essere *persistente*. La regressione spontanea è più frequente nelle giovani donne ed è legata soprattutto ai ceppi a basso rischio, mentre la persistenza dell'infezione è più frequente nelle donne di età più adulta/avanzata ed è dovuta principalmente ai tipi di HPV ad alto rischio [16, 20]. La clearance virale può avvenire precocemente entro poche settimane, in maniera fluttuante e ricorrente, o tardivamente dopo 24 mesi. Le infezioni pregresse possono essere dimostrate dalla presenza di anticorpi specifici. Le infezioni persistenti possono decorrere in maniera *latente* verosimilmente in piccoli foci di cellule, in assenza di lesione virale evidenziabile mediante la citologia, la colposcopia e l'esame istologico; la presenza del virus può essere identificata mediante metodiche di biologia molecolare (sonde a DNA o RNA). La durata della latenza, le condizioni

che possono causare una riattivazione dell'infezione e la correlazione con i carcinomi cervicali non sono chiaramente noti [11]. Le infezioni *subcliniche* sono evidenziabili mediante la citologia, la colposcopia e l'istologia, e possono essere associate alla CIN. Le infezioni *cliniche o produttive* sono osservabili anche clinicamente, oltre che essere diagnosticate con le comuni metodiche, si sviluppano con i tipi a basso rischio e spesso sono benigne (Figg. 5 e 6) [20].

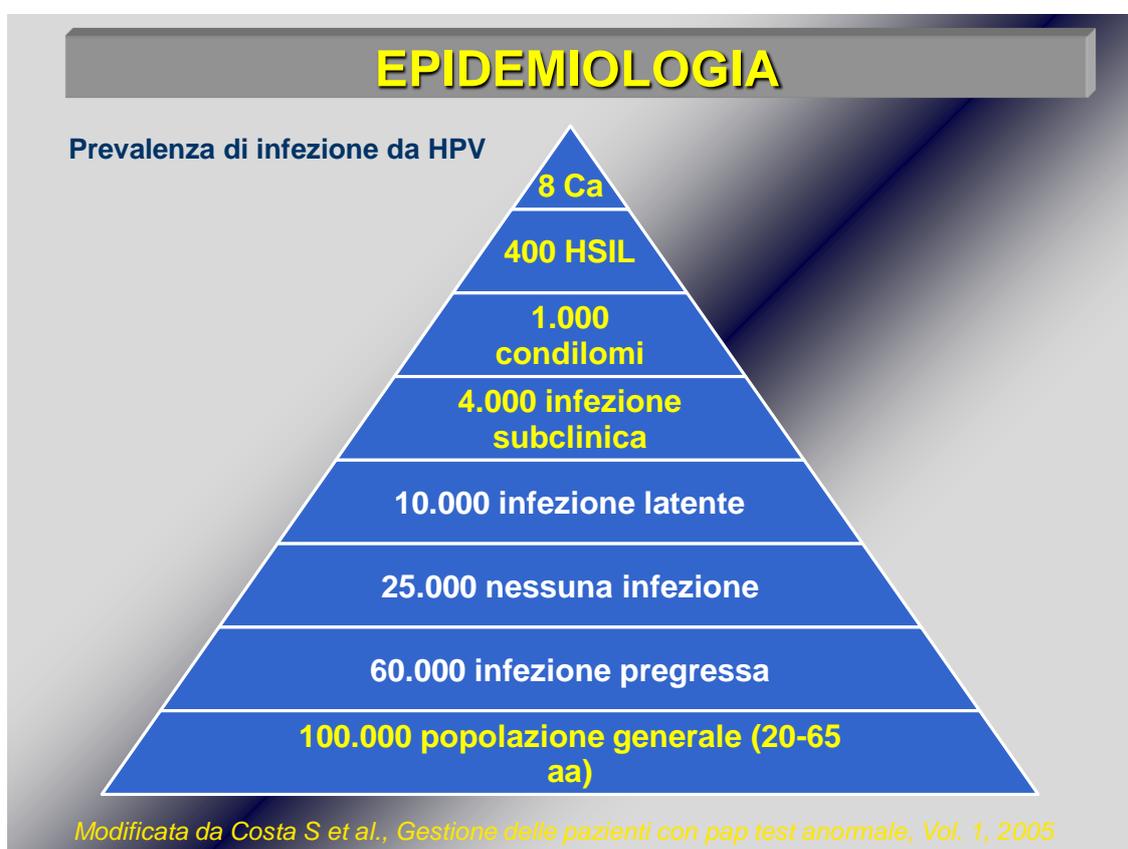
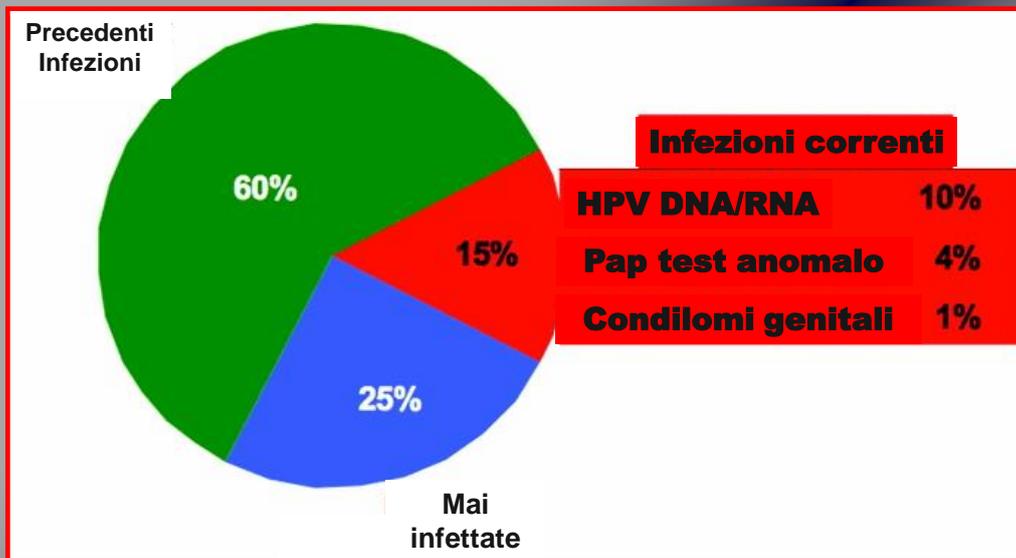


Figura 5. Prevalenza stimata dell'infezione genitale da HPV su una popolazione di 100.000 donne: di queste solo 400 hanno lesioni di alto grado e 8 sviluppano un carcinoma cervicale [12, 20, 24].

EPIDEMIOLOGIA



Dati di Koutsky, *Epidemiology of genital human papillomavirus infection, 1997*
Grafico di Frazer et al., *The Pediatric Infectious Disease Journal, 2006*

Figura 6. Percentuali stimate della popolazione esposta ad HPV: il 10% della popolazione infetta ha un'infezione attiva, il 4% ha un'infezione che causa Pap test anormale, l'1% ha un'infezione che causa condilomi genitali [9, 12].

1.5.4 Acquisizione, clearance e persistenza di HPV

Vari fattori contribuiscono al rischio di infezione e quindi di eventuali lesioni HPV correlate, quali i condilomi genitali, la CIN o il cancro invasivo. Il numero di partner sessuali pregressi e attuali, l'età del primo rapporto, il fumo, l'uso di contraccettivi orali, l'età, una storia di condilomi genitali, che si associano ad un aumentato rischio di infezione anche a livello cervicale, altre malattie sessualmente trasmesse, quali in particolare le infezioni genitali da Herpes simplex virus (HSV) e Chlamydia trachomatis, la multiparità, il polimorfismo del sistema HLA coinvolto nella risposta del sistema immunitario, l'infezione da HIV e, in generale, gli stati di immunodepressione, congeniti o acquisiti, e verosimilmente

anche fattori nutrizionali, sono tra i più noti cofattori dell'infezione da HPV e dello sviluppo del tumore invasivo [15]. Dai dati riportati in letteratura emerge che approssimativamente la metà delle adolescenti e delle giovani donne sessualmente attive acquisisce l'infezione da HPV entro 5 anni dal primo rapporto (Fig. 7) [9, 14, 25-27]. Il rischio di infezione aumenta in caso di nuovo partner, come riportato in uno studio su giovani donne, in cui il 20% di quelle con un solo partner era infetto, contro il 55% di quelle che avevano avuto 4-5 partner [28]. Naturalmente, sono influenti anche le abitudini sessuali maschili, nonché la circoncisione maschile, che sembra ridurre il rischio di trasmissione e di acquisizione dell'infezione, così come il rischio di cancro cervicale [29]. Dunque, l'attività sessuale rappresenta il principale fattore di rischio per acquisire l'infezione da HPV. Anche la giovane età rappresenta un fattore determinante: la riduzione dell'infezione osservata dopo i 30 anni non sembra essere legata a un cambiamento delle abitudini sessuali, quanto invece alla risposta immunitaria.

Sebbene non si conosca l'esatto meccanismo d'azione, i fattori sopraelencati si associano direttamente o indirettamente ai comportamenti sessuali. Ad esempio, la stessa giovane età del coitarca può essere sia un indicatore di comportamenti sessuali, quali un numero elevato di partner sessuali o una maggiore propensione a "ingaggiarne" nuovi più frequentemente, oppure può essere un reale fattore di rischio di infezione per l'ectopia cervicale tipica delle giovani adolescenti. L'uso del condom può non essere completamente protettivo, anzi, paradossalmente, sembra essere correlato a un maggior rischio di infezione, verosimilmente perché usato più frequentemente con partner a rischio, nuovi o occasionali [11, 30]. L'infezione da HSV può provocare delle lesioni epiteliali, favorendo la penetrazione dell'HPV negli strati epiteliali più profondi. Le infezioni cervicali, inoltre, determinano uno stato infiammatorio che può determinare

un danno ossidativo cellulare, così come il fumo può apportare danni cellulari aggiuntivi, accelerando l'eventuale progressione verso la malignità [31].

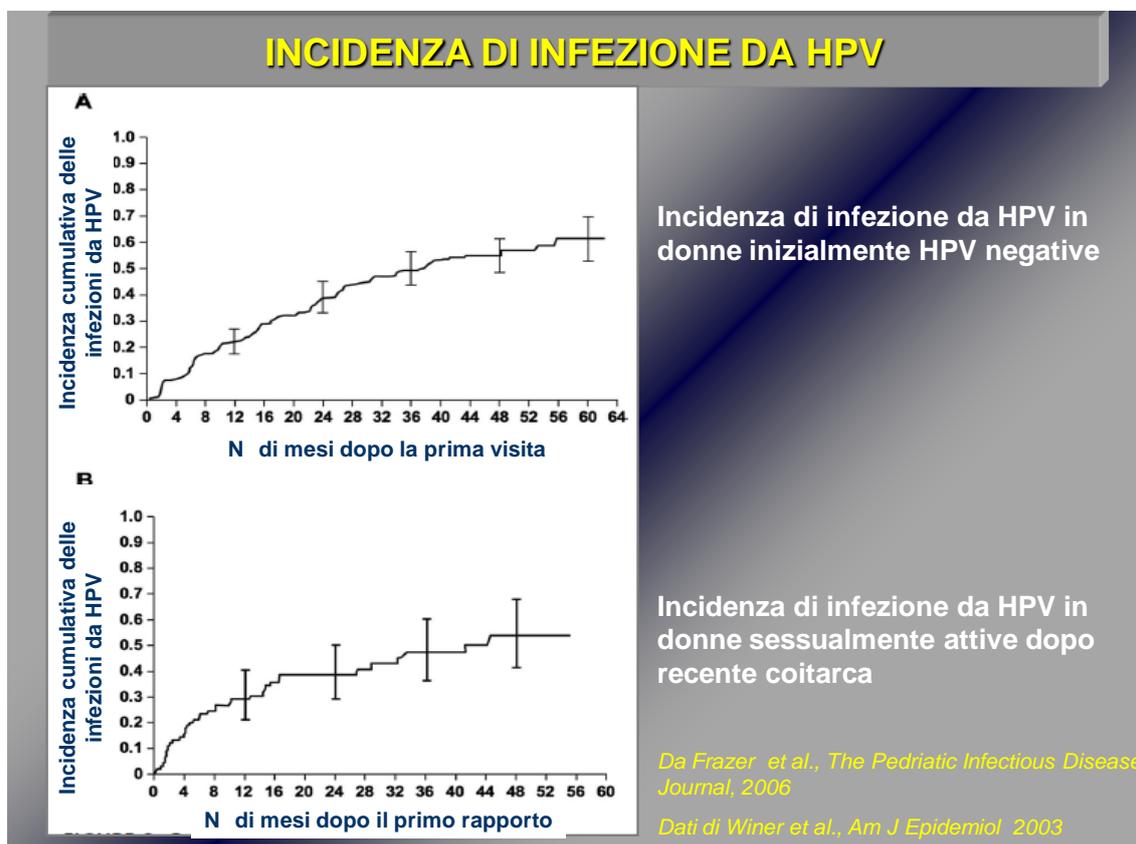


Figura 7. Incidenza cumulativa delle infezioni da HPV in donne inizialmente negative e in quelle sessualmente attive dopo recente coitarca [9, 25].

L'infezione da HPV, a differenza di altre infezioni genito-urinarie, non si manifesta con sintomi, quali prurito, bruciore e perdite vaginali. L'infezione decorre, dunque, asintomatica e, nella maggior parte dei casi (70-90%) [9], si risolve spontaneamente entro 24-36 mesi o anche meno secondo alcuni studi, non sviluppando alcuna malattia clinica. In uno studio è riportata un tempo medio di clearance virale di 8.9 e 7 mesi per i tipi ad alto e a basso rischio, rispettivamente (Fig. 8) [32]. L'esatto meccanismo di clearance virale non è comunque completamente conosciuto. Sicuramente

il sistema immunitario dell'organismo ospite è coinvolto nel controllo delle infezioni da HPV. Tuttavia, è probabile che il ciclo vitale stesso del virus sia autolimitante. Alcuni hanno suggerito che il sistema immunitario costringa il virus in uno stato di latenza prolungato [9, 15].

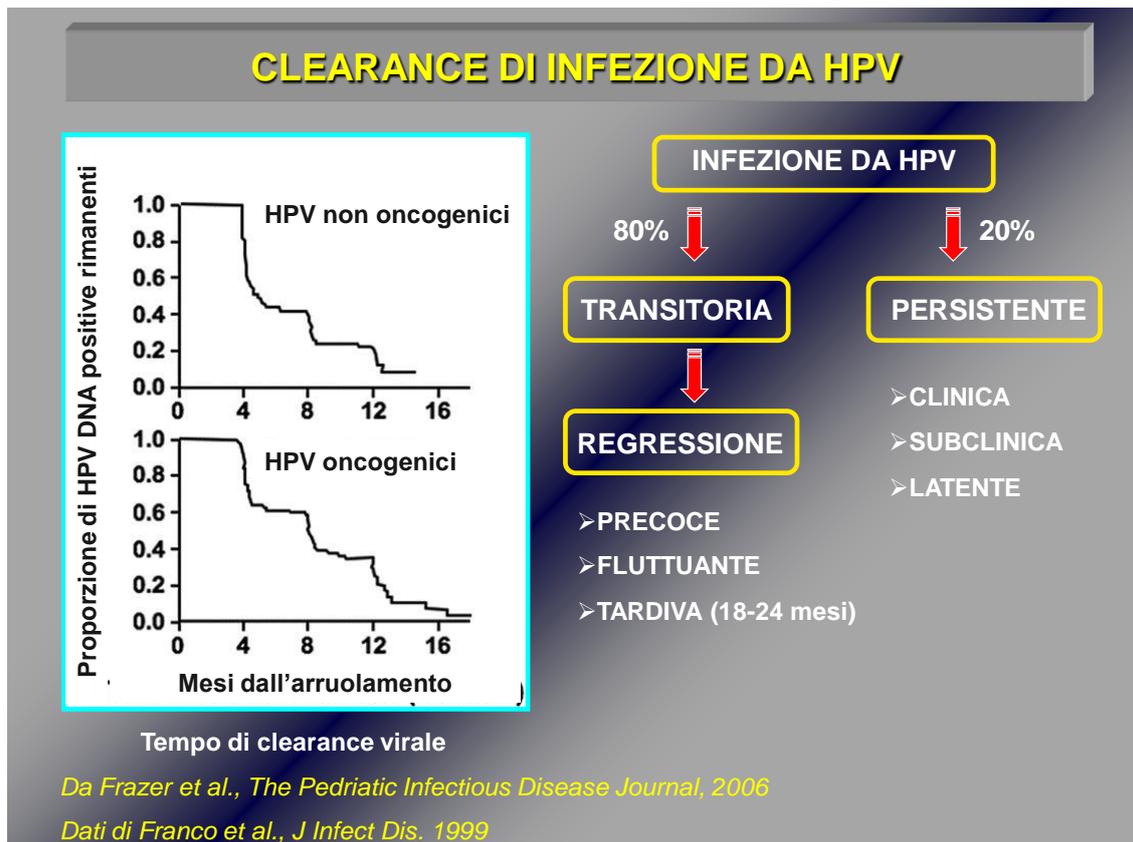


Figura 8. Tempo di clearance di infezioni da LR-HPV e HR-HPV: tempo medio di 7.0 mesi e 8.9 mesi, rispettivamente [9, 15].

Come già riportato, nella maggior parte degli studi epidemiologici è stato riscontrato un declino della prevalenza dell'infezione da HPV con l'aumentare dell'età, come confermato anche in uno studio su prostitute adulte, nonostante i costanti elevati livelli di attività sessuale [31, 33]. Questo trend trova una spiegazione plausibile nella risposta immunitaria contro l'HPV da parte dell'organismo ospite.

Tuttavia, in numerosi altri studi epidemiologici è emerso un secondo pattern di prevalenza dell'infezione da HPV correlata all'età, che vede un secondo picco di prevalenza dell'infezione in età peri- o post-menopausale, minore del primo (Fig. 9) Ciò potrebbe essere dovuto ad alcuni fattori, anche concomitanti, quali la riattivazione di pregresse infezioni latenti dovuta a un calo graduale delle difese immunitarie tipo-specifiche e l'acquisizione di nuove infezioni in seguito al contatto sessuale con nuovi partner. È stato ipotizzato che si possa trattare di un effetto di coorte: le variazioni età correlate della prevalenza possono riflettere la diversa esposizione al virus nelle varie generazioni, in considerazione dei cambiamenti verificatisi nelle abitudini sessuali negli ultimi decenni [31].

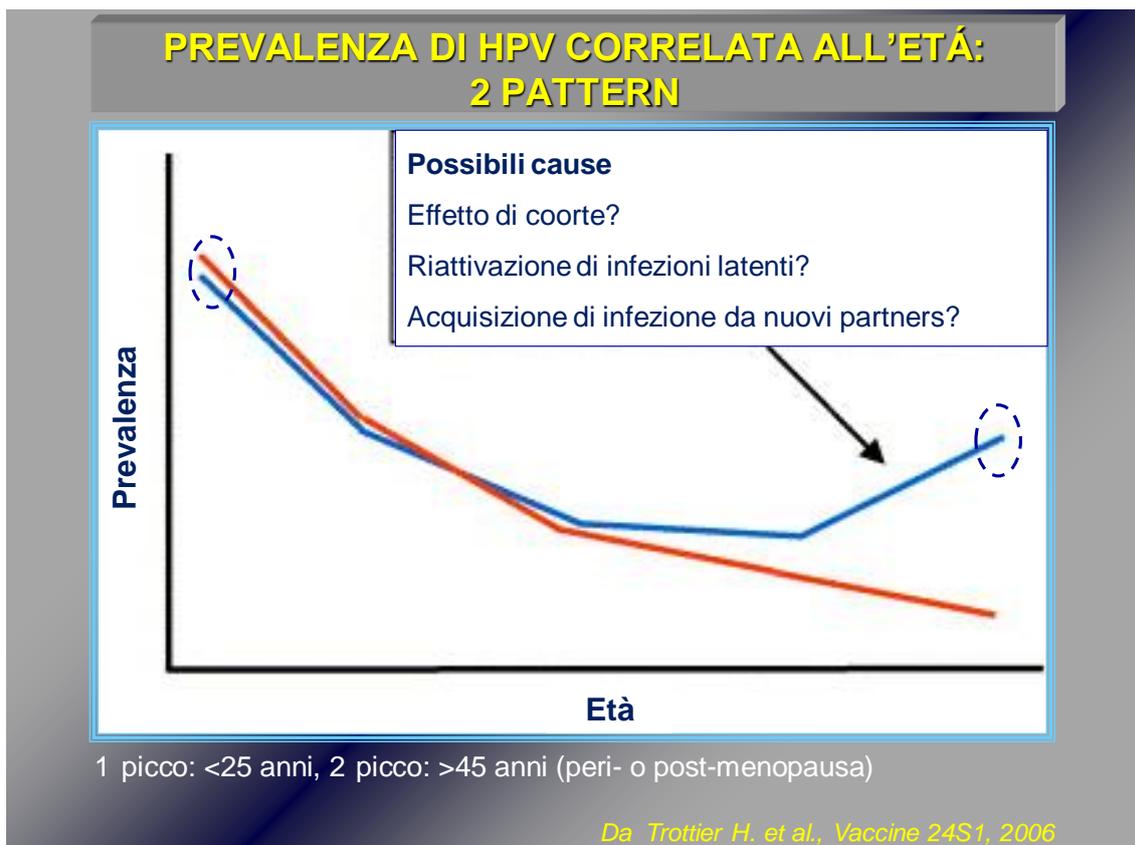


Figura 9. Pattern di prevalenza di infezione da HPV in base all'età [31].

Secondo questo secondo pattern, dunque, la prevalenza dell'infezione da HPV raggiunge un primo picco nelle donne di età <25 anni, declina nei decenni successivi e poi raggiunge un secondo picco in perimenopausa (>45 anni) o dopo la menopausa (>55 anni) (Figg. 10-12) [13, 16, 34].

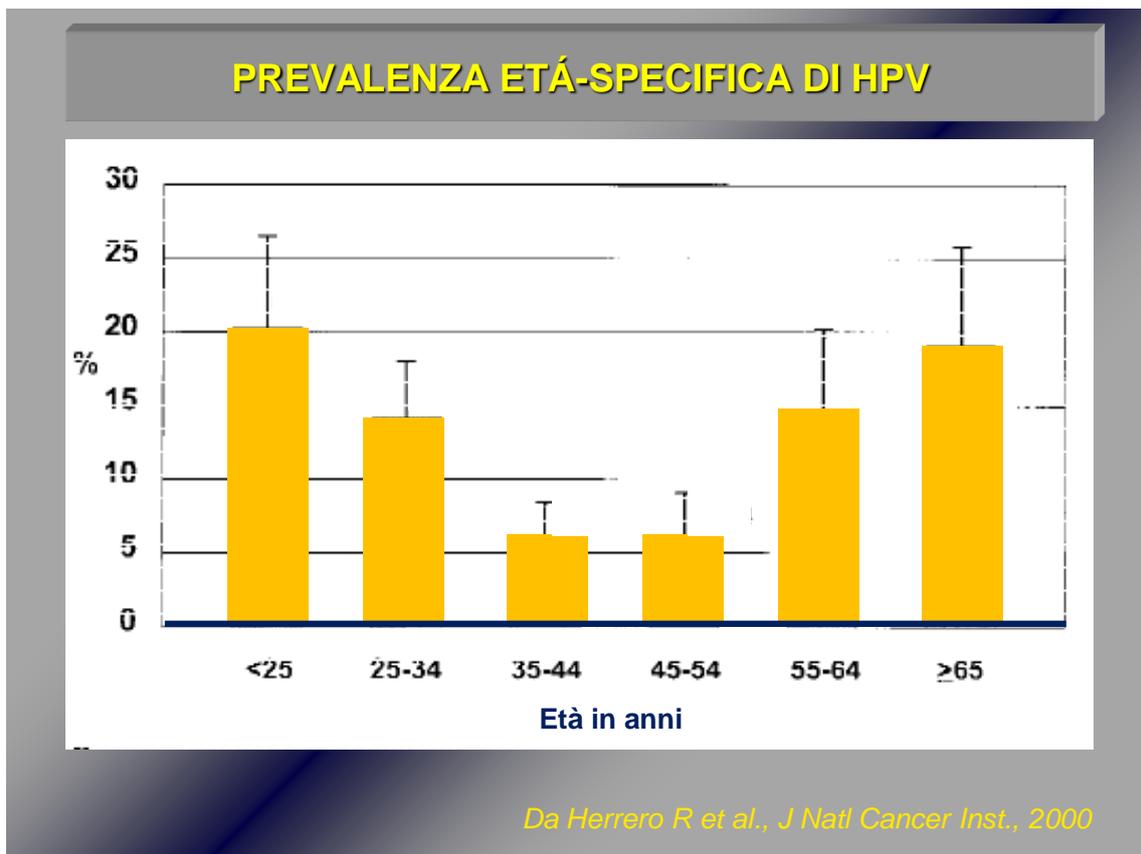
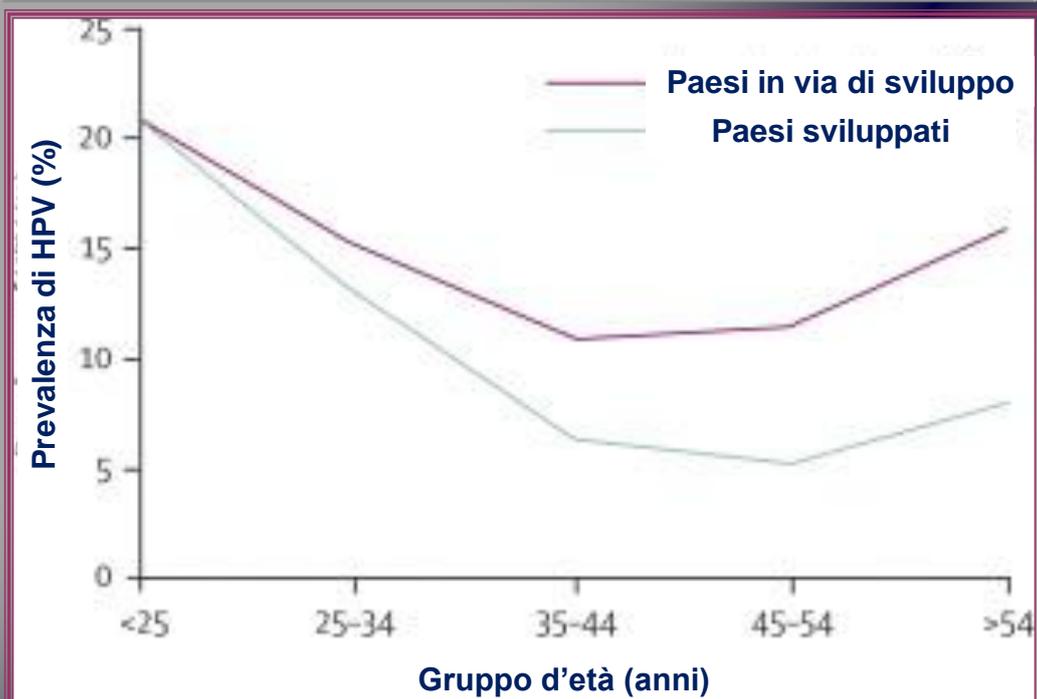


Figura 10. Prevalenza età specifica di infezione da HPV in donne con citologia normale o ASCUS [13].

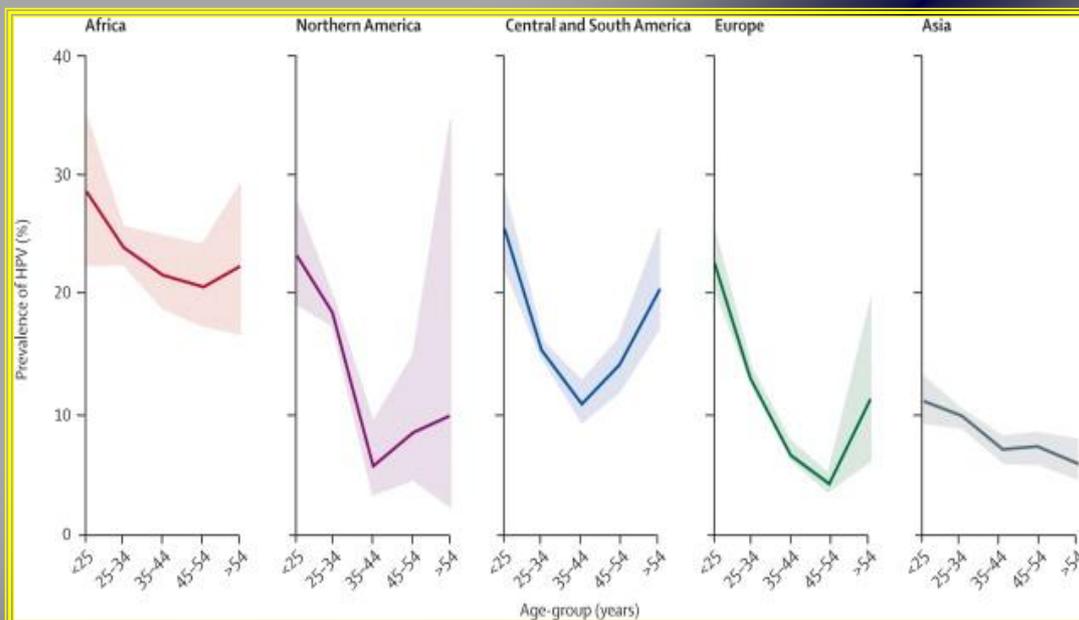
PREVALENZA ETÁ-CORRELATA DI HPV



De Sanjosé S, et al, Lancet Infect Dis, 2007

Figura 11. Prevalenza di infezione da HPV in base all'età in donne con citologia normale nel mondo. Nei Paesi sviluppati la prevalenza è stata stimata del 10% contro il 15.5% dei Paesi in via di sviluppo [34].

PREVALENZA ETÀ-CORRELATA DI HPV NEL MONDO

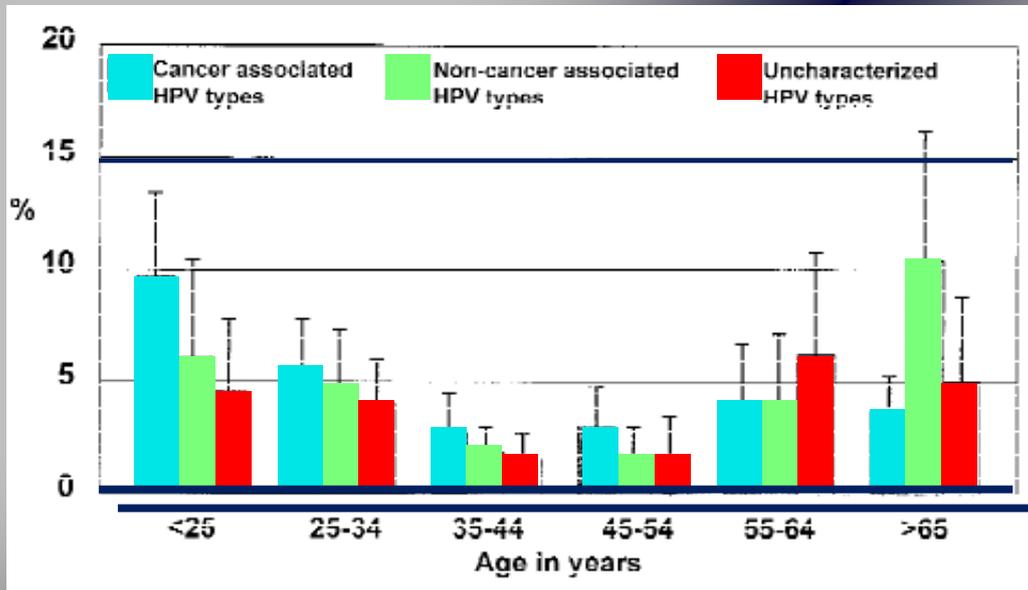


De Sanjosé S. et al, Lancet Infect Dis, 2007

Figura 12. Prevalenza dell'infezione da HPV in base all'età in donne con citologia normale nel mondo: meta-analisi. La prevalenza complessiva è stata stimata del 10.4% (Africa 22.1%, America Centrale e Messico 20.4%, Nord America 11.3%, Europa 8.1%, e Asia 8.0%). In tutte le regioni del mondo considerate la prevalenza è risultata più alta nelle donne al di sotto dei 35 anni d'età, con un evidente secondo picco nelle donne di età ≥ 45 anni, tranne che in Asia [34].

Da diversi studi emerge che il primo picco di prevalenza dell'infezione da HPV è dovuto prevalentemente ai tipi ad alto rischio, mentre il secondo picco è più accentuato per i tipi a basso rischio (Figg. 13-14) [13, 16].

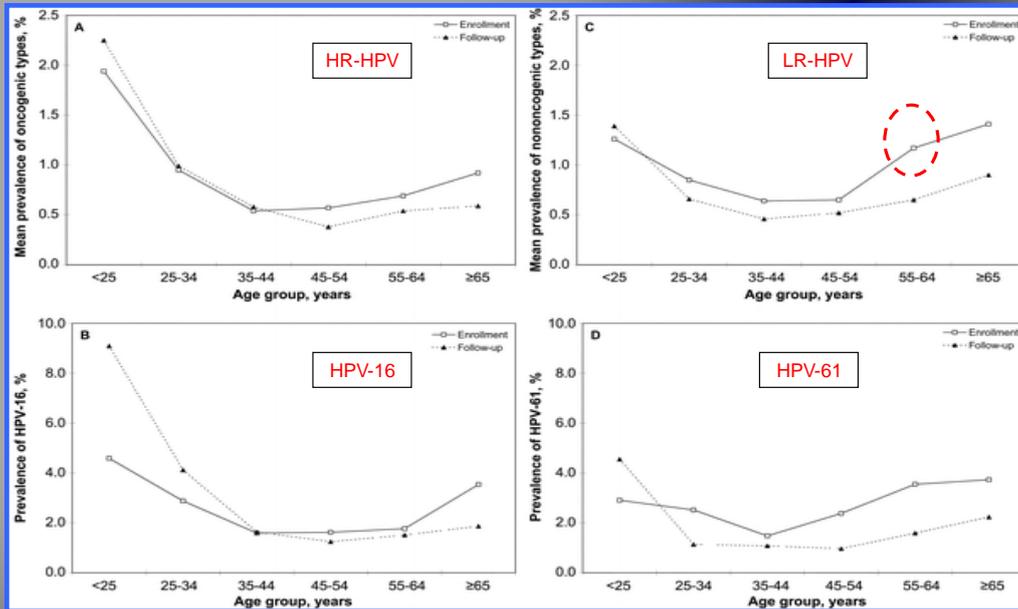
PREVALENZA ETÀ-SPECIFICA DI HR-HPV e LR-HPV



Da Herrero R et al., J Natl Cancer Inst., 2000

Figura 13. Prevalenza età-specifica di HR-HPV e LR-HPV: i tipi di HPV associati al carcinoma cervicale sono predominanti nelle donne più giovani (<25 anni), quelli non associati al carcinoma sono predominanti nelle donne in età postmenopausale [13].

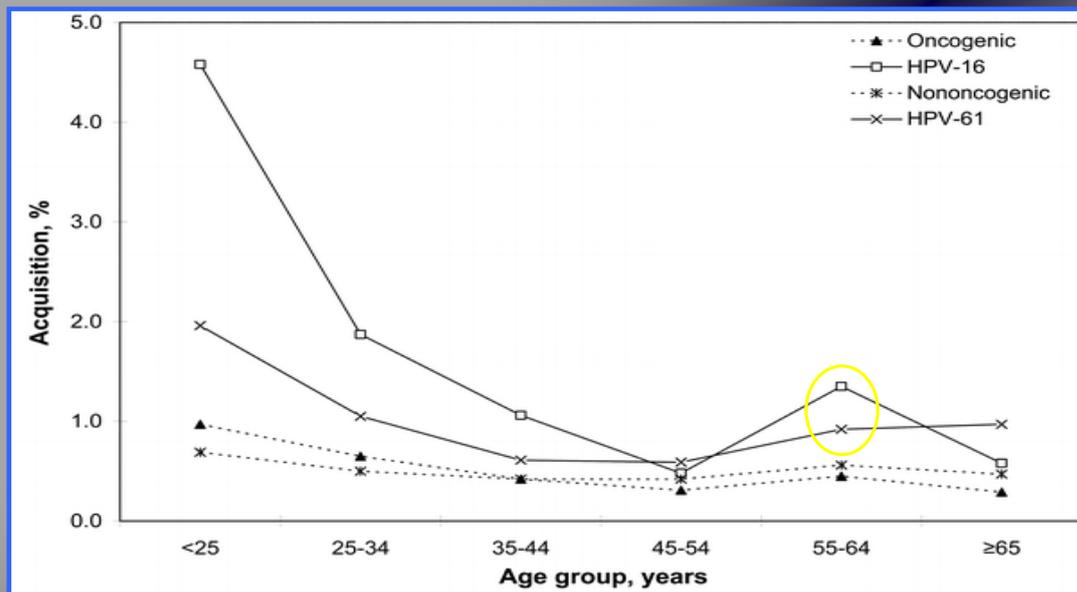
PREVALENZA DELL'INFEZIONE DA HPV ETÀ-CORRELATA



Castle et al., The Journal of Infectious Diseases, 2005

Figura 14. Curve di prevalenza di HPV (a forma di U) in base all'età in Costa Rica: la prevalenza è più alta nella giovane età sia per gli HR- che LR- HPV. Il secondo picco nelle donne più adulte è maggiore per i LR-HPV [16].

ACQUISIZIONE ETÀ-CORRELATA DI HPV



Castle et al., The Journal of Infectious Diseases, 2005

Figura 15. L'acquisizione dell'infezione da HPV si riduce con l'aumentare dell'età, aumenta lievemente in media età per poi ridursi oltre i 65 anni [16].

L'acquisizione dell'infezione, sia con i tipi oncogenici che non oncogenici, generalmente si riduce con l'aumentare dell'età, confermando quanto precedentemente ribadito, ma con un lieve aumento nelle donne d'età media e successiva riduzione dopo i 65 anni (Fig. 15) [16].

Di contro, la persistenza dell'infezione aumenta con l'aumentare dell'età, sia per gli HR-HPV che per i LR-HPV (Figg. 16-17) [16]. Ed è proprio l'infezione persistente da HPV (rilevazione dello stesso DNA virale in almeno 2 test successivi a distanza di almeno 6-12 mesi) il principale fattore di rischio per lo sviluppo del cervico-carcinoma. La persistenza dell'HPV è strettamente associata alle lesioni di alto grado CIN2-3/HSIL+ tanto più quanto più lunga è la durata dell'infezione e più ampio è

l'intervallo tra i test. Dunque, l'individuazione di HPV DNA persistente può essere considerato un marker clinico di rischio di cancro cervicale [35].

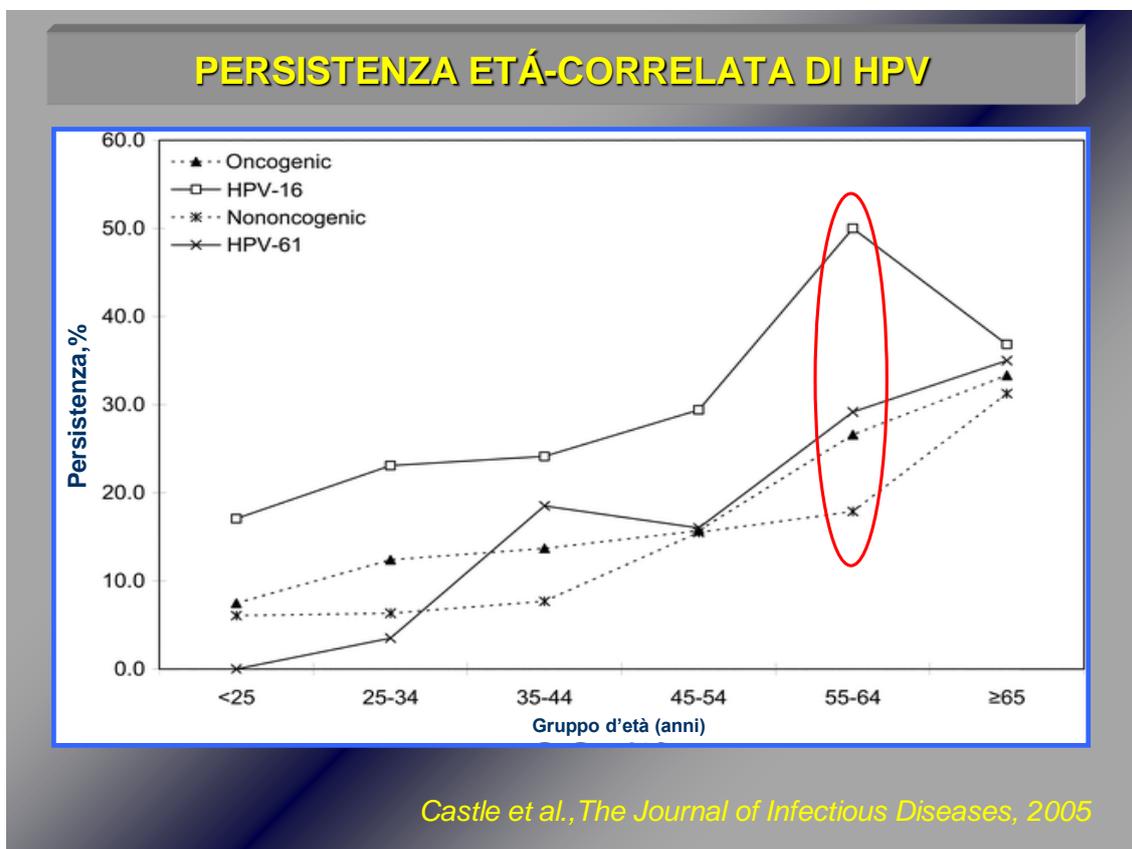
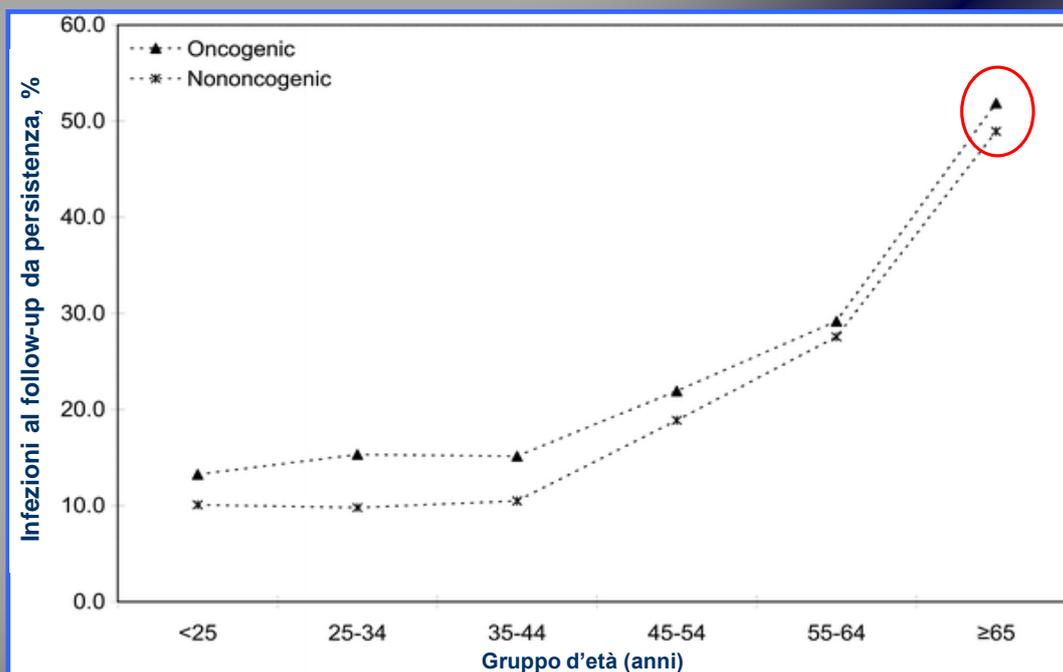


Figura 16. La persistenza dell'infezione aumenta con l'età, sia per gli HR- che i LR-HPV [16].

PERSISTENZA ETÁ-CORRELATA DI HPV



Castle et al., *The Journal of Infectious Diseases*, 2005

Figura 17. Infezioni da HPV in base all'età al follow-up come risultato della persistenza [16].

1.6 Storia naturale delle lesioni cervicali e carcinogenesi

Come già sottolineato, l'infezione persistente da HPV rappresenta la condizione necessaria per lo sviluppo del carcinoma cervicale. I fattori di rischio descritti per l'acquisizione dell'infezione da HPV possono comportarsi da cofattori per l'insorgenza del tumore, contribuendo a rendere l'infezione persistente o influenzando la progressione delle lesioni in senso tumorale (Fig. 18) [11, 31].

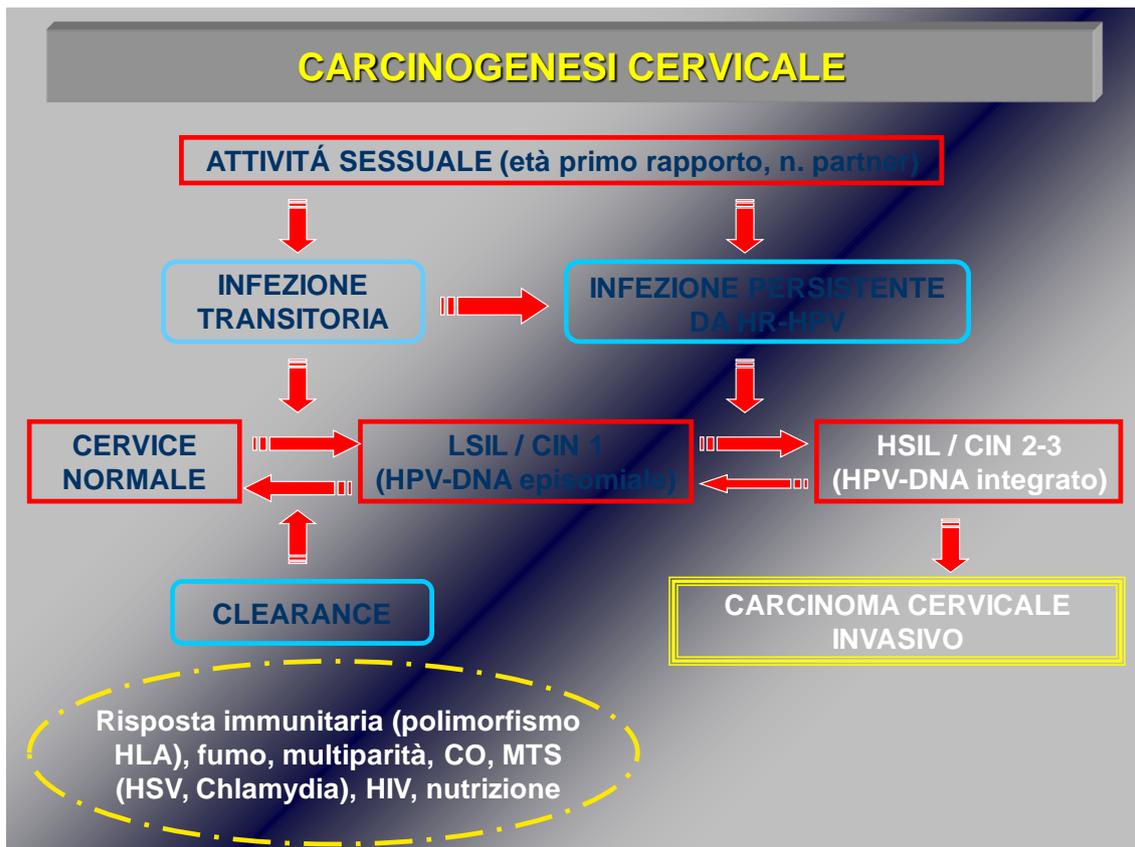
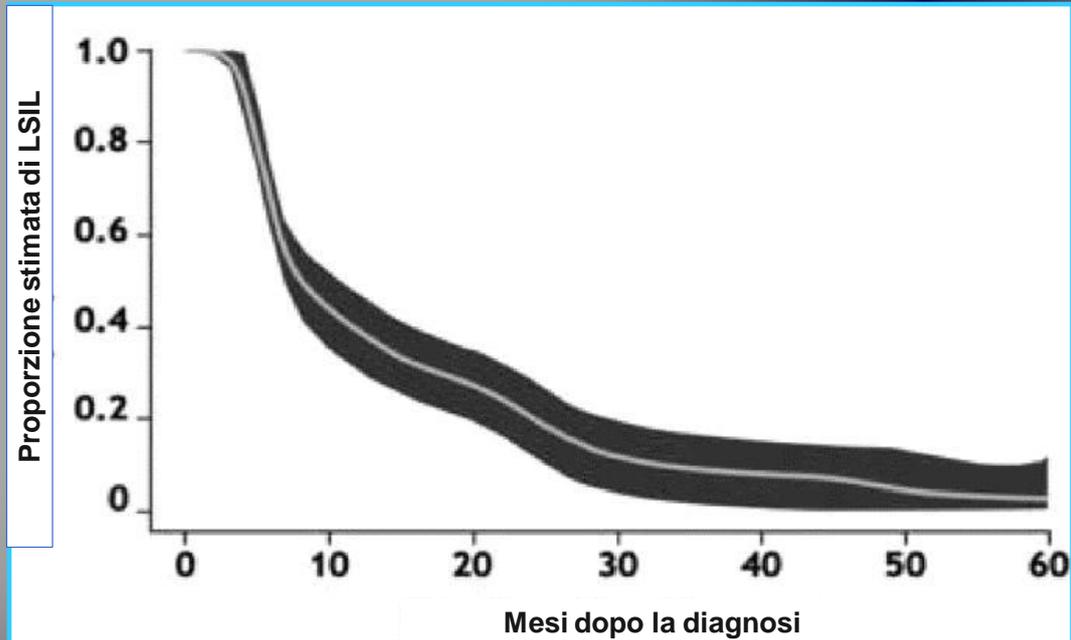


Figura 18. I principali step nella carcinogenesi cervicale comprendono l'infezione da HPV, la sua persistenza oltre un determinato periodo, la progressione verso lesioni preinvasive fino al carcinoma invasivo. Alcuni step sono reversibili e includono la clearance virale e la regressione delle lesioni premaligne. CO: contraccettivi orali. MTS: malattie sessualmente trasmesse.

Analogamente alle infezioni, anche le lesioni HPV correlate possono regredire in una percentuale correlata al grado della lesione stessa (Tab. 1 e 2). La prevalenza di LSIL è maggiore nelle ragazze al di sotto dei 25 anni e si riduce rapidamente con l'età. Dunque, le adolescenti e le giovani di età <25 anni sono ad alto rischio di infezione da HPV e di lesioni di basso grado ad esso associate, tuttavia oltre il 90% delle LSIL regredisce entro 3 anni (Fig. 19) [13, 36].

STORIA NATURALE DELLE LESIONI SQUAMOSE INTRAEPITELIALI



Da Frazer I et al., *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2006

Figura 19. Regressione di LSIL nelle adolescenti [36].

La prevalenza di HSIL raggiunge un primo picco nella fascia d'età tra i 25 e i 34 anni, e un secondo picco di entità simile dai 65 anni in poi, come riportato nello studio di Herrero et al. [13], suggerendo un probabile ruolo delle infezioni latenti riattivate e, dunque, una probabile relazione con il secondo picco di infezione da HPV.

L'evoluzione delle lesioni intraepiteliali prevede la progressione verso una lesione più grave o verso la neoplasia invasiva, la persistenza o la regressione verso la normalità o una lesione meno severa [19]. La maggior parte delle lesioni di basso grado sono transitorie e la percentuale di regressione diminuisce con l'aumentare della severità della lesione: 60% per la CIN1, 40% per la CIN2 e 33% per la CIN3. Al contrario, il tasso di progressione risulta minore per le lesioni di basso grado rispetto a quelle di alto grado, con tempi verosimilmente maggiori per queste ultime (Tab. 2).

I tassi di progressione a HSIL e cancro invasivo sono rispettivamente del 7.13% e 0.25% per l'ASCUS, del 20.81% e 0.15% per l'LSIL, del 23.37% e 1.44% per le lesioni di alto grado. I tassi di regressione alla normalità sono, invece, del 68.19%, 47.39% e 35.03% rispettivamente per ASCUS, LSIL e HSIL (Tab. 1) [37].

STORIA NATURALE DELLE LESIONI SQUAMOSE INTRAEPITELIALI: META-ANALISI			
a 24 mesi	ASCUS	LSIL	HSIL
REGRESSIONE verso NORMALE	68%	47%	35%
PROGRESSIONE a HSIL	7%	21%	23%
PROGRESSIONE a CANCRO INVASIVO	0.25%	0.15%	1.44%

Melnikow J et al., Obstet Gynecol, 1998

Tabella 1. *Regressione e progressione delle lesioni squamose intraepiteliali [37].*

EVOLUZIONE DELLA CIN: REVIEW

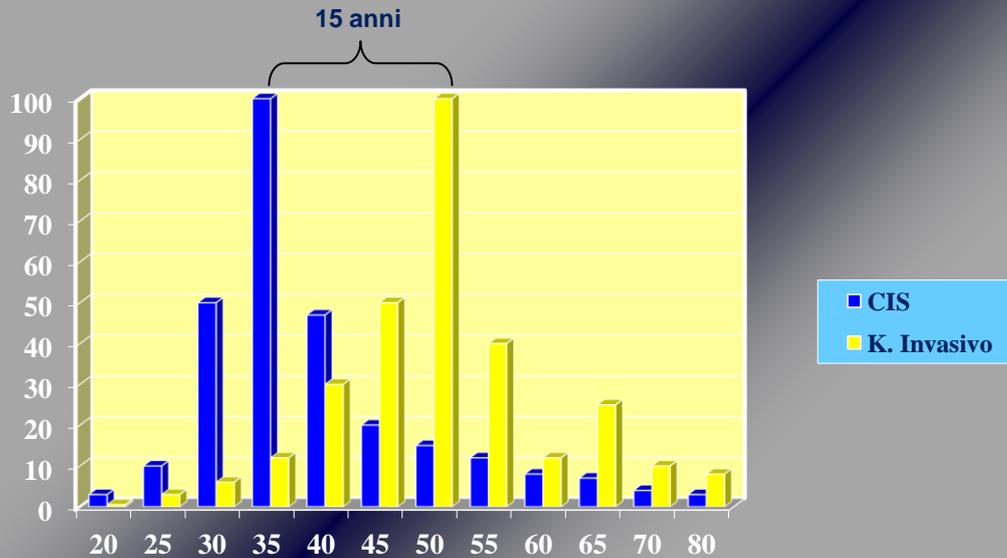
	CIN1	CIN2	CIN3
REGRESSIONE A QUALSIASI GRADO	60%	40%	33%
PERSISTENZA	30%	40%	-
PROGRESSIONE A CIN3	10%	20%	-
PROGRESSIONE a CANCRO INVASIVO	1%	5%	12%

Ostör AG, Int J Gynecol Pathol., 1993

Tabella 2. *Regressione, persistenza e progressione delle neoplasie intraepiteliali cervicali [38].*

Questi processi generalmente avvengono nell'arco di diversi anni. È stato stimato che la neoplasia intraepiteliale cervicale (CIN) richieda in media almeno 10 anni per diventare invasiva, con un intervallo di 3-15 anni in base alla gravità delle lesioni e all'età delle pazienti. Tale ipotesi è supportata dal fatto che l'incidenza della CIN3 è maggiore in donne più giovani (età media 35 anni) di 10-15 anni di quelle con carcinoma invasivo (età media 50 anni) (Fig. 20) [20].

PREVALENZA DEL CARCINOMA IN SITU E DEL CARCINOMA INVASIVO IN FUNZIONE DELL'ETÀ



Da Costa S, Syrjanen K; Gestione delle pazienti con Pap test anormale, Athena Ed. 2005

Figura 20. Percentuale di massima prevalenza del carcinoma in situ (CIS) e invasivo (K) in funzione dell'età [20].

Il lungo intervallo tra la fase intraepiteliale e la fase invasiva consente di effettuare un'efficace prevenzione tramite lo screening citologico.

Tuttavia, più recentemente è emerso da alcuni studi che un'infezione da HPV16/18 può progredire verso CIN2/3 o cancro entro 36-120 mesi [15, 39, 40]. In letteratura sono riportati casi di giovani donne che hanno sviluppato una neoplasia invasiva nonostante lo screening citologico negativo [41]. Pur considerando la possibilità di Pap test falsi negativi, è ragionevole ritenere che in alcune situazioni si verifichi una rapida progressione, dell'ordine di mesi e non di anni, da epitelio metaplasico immaturo a CIN3 e da questo a carcinoma invasivo, by-passando le fasi descritte nella storia naturale del cervicocarcinoma. Dunque, considerando l'intervallo medio di progressione tra SIL e carcinoma di 10-15 anni, una

quota limitata di casi si colloca agli estremi della curva, per cui da un lato esisterebbero casi di neoplasia dopo i 65 anni d'età, dall'altro casi con decorso particolarmente rapido, addirittura nell'intervallo tra due Pap test. In conclusione, la progressione delle displasie HPV correlate è sostenuta da ceppi ad alto rischio oncogeno (in particolare HPV 16 e 18) e dipende principalmente dalla loro persistenza, dall'integrazione del DNA virale nel genoma cellulare e dall'espressione degli oncogeni E6 ed E7.

Capitolo 2

2.1 Introduzione

Come ampiamente riportato nel capitolo precedente, l'infezione da Papillomavirus Humano (HPV) è una delle più frequenti infezioni trasmesse sessualmente, che coinvolge comunemente le adolescenti e le donne più giovani dopo l'inizio dell'attività sessuale [8, 9]. È ormai ampiamente riconosciuto il ruolo carcinogenetico dell'HPV, identificato come fattore necessario, anche se non sufficiente, per lo sviluppo del cancro cervicale, il secondo tumore più comune che colpisce le donne nel mondo. Il DNA virale è individuato, infatti, in oltre il 99.7% dei casi di carcinoma cervicale [1-6]. Sono stati identificati oltre 100 genotipi virali, la maggior parte dei quali non sono correlati a tumori [7, 11]. Degli oltre 40 genotipi che mostrano tropismo per le mucose genitali, alcuni sono classificati a basso rischio e altri ad alto rischio oncogeno. In particolare, tra questi ultimi l'HPV16 e l'HPV18 sono individuati in circa il 70% dei casi di cervicocarcinoma [3, 17, 42]. Sebbene il rischio di contrarre l'HPV nel corso della vita sia maggiore dell'80%, la maggior parte delle infezioni sono transitorie e regrediscono spontaneamente entro 1-2 anni, soprattutto nelle giovani, per cui la maggior parte delle donne con infezione da HR-HPV non svilupperà il tumore [22, 43]. L'infezione persistente da HR-HPV, invece, è potenzialmente responsabile di modificazioni cellulari a livello cervicale, di lesioni precancerose (neoplasie cervicali intraepiteliali) di basso e di alto grado, fino alle forme invasive. Fortunatamente, nella maggior parte dei casi l'insorgenza del cervico-carcinoma richiede anni o decenni dall'infezione; infatti, il picco dell'infezione da HPV è circa a 20 anni, il picco di incidenza della CIN3 è intorno a 30 anni, il picco di

incidenza del carcinoma cervicale è dopo i 40 anni, nel corso della 5° decade [18].

2.2 Pap test e tecnologie molecolari emergenti a confronto

La diffusione dei programmi di screening adeguatamente organizzati basati sulla citologia (Pap test) ha consentito di individuare precocemente le lesioni precancerose, prevenendo nei paesi sviluppati fino all'80% dei tumori invasivi [44]. Tuttavia, la citologia è gravata da un'alta percentuale di falsi negativi, con una sensibilità che oscilla tra il 30% e l'87% [45, 46]. Di conseguenza, alcune lesioni possono non essere riconosciute e, pertanto, le donne vengono sottoposte a controlli ripetuti a intervalli regolari per validare gli esiti negativi. Inoltre, l'esame citologico non consente di individuare la ristretta minoranza di donne che svilupperà un tumore invasivo, distinguendole dalla vasta maggioranza di donne che presentano lesioni che regrediranno spontaneamente [43, 47]. In considerazione dell'esigenza di distinguere le infezioni virali transitorie da quelle persistenti, negli ultimi anni sono state introdotte metodiche molecolari che individuano la presenza dell'HPV, suscitando un vivo interesse per le loro potenziali applicazioni nei programmi di screening e nel follow-up post trattamento. Tra i test esistenti alcuni mirano alla ricerca del DNA di HPV (HPV DNA test), altri all'individuazione degli mRNA virali che codificano per le oncoproteine E6/E7 (HPV mRNA test). I primi valutano la presenza o assenza del genoma virale (HPV DNA), con una sensibilità di oltre il 90% per le lesioni intraepiteliali di alto grado e i carcinomi invasivi [18]. Dunque, per la loro accuratezza i test per l'HPV-DNA trovano potenziale applicazione in 4 condizioni: 1) come test di screening primario, da solo o in combinazione con il Pap test; 2) come test di triage per selezionare le pazienti che presentano alterazioni citologiche border-line (ASCUS) o di

basso grado (LSIL), e che necessitano di un approfondimento diagnostico mediante colposcopia e di eventuale trattamento; 3) nella gestione di quelle pazienti afferite alla colposcopia in assenza di lesioni visibili; 4) nel follow-up delle pazienti sottoposte a trattamento escissionale per lesioni intraepiteliali di alto grado, per valutare la radicalità della terapia, individuando precocemente il rischio di recidiva e/o persistenza [18]. Nonostante il loro alto valore predittivo negativo (>90%) [48, 49], i test per l'HPV DNA, tuttavia, risultano poco specifici nell'individuare le lesioni istologiche di alto grado, con una specificità di circa il 60% nel triage dell'ASCUS e approssimativamente del 30% nel triage dell'LSIL (Tab.1) [18]. Inoltre, il valore predittivo positivo (VPP) risulta basso per l'alta prevalenza di infezioni da HPV transitorie, che non provocheranno lesioni cervicali, in particolare nelle donne più giovani [48, 50]. Dunque, l'identificazione delle infezioni persistenti, quelle cioè a rischio di sviluppare lesioni di alto grado, richiede un monitoraggio con HPV DNA test ripetuti.

I test basati sull'RNA consentono, invece, di individuare gli RNA messaggeri (mRNA) degli oncogeni virali E6 ed E7, correlati allo sviluppo del cancro, sovraespressi in seguito all'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite. Le oncoproteine codificate da questi oncogeni promuovono la crescita cellulare irregolare e deregolata mediante l'inattivazione di proteine cellulari oncosoppressori, p53 e Rb. Il ruolo degli HPV nella carcinogenesi cervicale è, dunque, strettamente correlato all'espressione persistente di E6/E7, che può essere considerata un indicatore di progressione verso la neoplasia cervicale intraepiteliale e il carcinoma invasivo, in quanto condizione necessaria per la trasformazione e il mantenimento delle cellule displastiche e neoplastiche [48]. La loro individuazione può consentire la distinzione delle infezioni da HPV

transitorie (in cui il DNA virale è generalmente in forma episomiale nella cellula ospite), caratterizzate da una bassa espressione di E6/E7, da quelle persistenti (in cui il DNA virale è prevalentemente integrato nel genoma cellulare), caratterizzate da un'elevata espressione di E6/E7 [51].

I test per l'HPV mRNA, pertanto, potrebbero avere un valore prognostico più alto e potrebbero migliorare la specificità e il valore predittivo positivo dei test per la ricerca di HPV DNA nello screening [50]. Tuttavia, mentre negli ultimi anni questi ultimi test sono stati largamente studiati nei programmi di screening, il valore predittivo degli HPV mRNA test non è ancora completamente conosciuto. In considerazione dell'alta percentuale di falsi negativi al Pap test, con il suo impatto di tipo sanitario e medico-legale, rimane crescente l'interesse verso questi test virali.

2.3 Cenni di tecniche molecolari virologiche

2.3.1 Metodi per la diagnosi di infezione da HPV

Le indagini diagnostiche (Pap test, colposcopia, esame istologico) volte a evidenziare le lesioni e le modificazioni cellulari indotte dall'HPV non sono in grado di rilevare la presenza del virus prima che questi abbia provocato un'alterazione della morfologia epiteliale. La diagnosi virologica di infezione da HPV si basa su metodi molecolari che consentono di evidenziare gli acidi nucleici virali, individuando gli HPV ad alto e a basso rischio oncogeno e identificando genotipi virali specifici. Il materiale biologico cervicale su cui eseguire le indagini può derivare da prelievo citologico in fase liquida o da prelievo bioptico. Le metodiche biomolecolari che rilevano il DNA di HPV sono: l'ibridazione diretta, l'ibridazione con amplificazione del segnale (Hybrid Capture 2 – HC2) e l'amplificazione del bersaglio (Reazione Polimerasica a Catena - PCR). I metodi di ricerca del DNA virale maggiormente utilizzati sono l'HC2, che

consente di discriminare tra HR- e LR-HPV, e i test di PCR, che consentono la genotipizzazione virale [20].

Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (HC2, Qiagen/Digene)

Tale metodo si basa sull'ibridazione in fase liquida tra il DNA di HPV presente nel campione e due cocktail di sonde a RNA, di cui uno è specifico per 13 HR-HPV (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), l'altro è specifico per 5 LR-HPV (HPV 6, 11, 42, 43, 44). L'ibrido DNA-RNA formatosi viene catturato su piastra mediante anticorpi specifici. Un secondo anticorpo anti-ibrido, marcato con fosfatasi alcalina con rivelazione chemiluminescente, ne consente la visualizzazione, emettendo una luce con intensità (misurata in "Relative Light Units" - RLU) direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione, e fornendo, dunque, una misura semiquantitativa della carica virale. L'HC2 è l'unico test per la ricerca di HPV approvato dalla Food and Drug Administration (FDA). È un saggio di semplice esecuzione ed automatizzabile, che consente solo la distinzione tra HPV ad alto e a basso rischio oncogeno e non la genotipizzazione virale. Alcuni studi hanno riscontrato una possibile cross-reattività del cocktail per HR-HPV con altri genotipi non oncogenici non rappresentati nel pool di sonde, dando luogo a risultati falsi positivi che inficiano la specificità del test [52].

Reazione Polimerasica a Catena – PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di amplificazione del DNA virale seguita da genotipizzazione. Esistono diverse strategie di amplificazione in PCR, tra cui una delle più usate prevede l'utilizzo di una coppia di primer di consenso o di PCR multiplex, che consentono l'amplificazione di regioni del genoma altamente conservate in diversi genotipi di HPV. I prodotti ottenuti vengono ibridati utilizzando sonde genotipo-specifiche per i diversi HPV. Tali sonde sono generalmente adese o a pozzetti di micropiastre (PCR-ELISA) o a strisce di nitrocellulosa (INNO-LiPA). L'ibrido target-bersaglio viene poi evidenziato grazie a un sistema di rivelazione colorimetrico o chemiluminescente.

2.3.2 Metodi per la determinazione della carica virale

Esistono, inoltre, tecniche per quantificare il DNA virale, in considerazione del fatto che la carica virale (*viral load*) sembra essere correlata all'integrazione del genoma dell'HPV e quindi al rischio di sviluppare il carcinoma cervicale. Alcuni dati suggeriscono che elevate cariche virali aumentano la probabilità di integrazione di HPV 16 nei cromosomi della cellula favorendone la crescita. Le cellule con HPV integrato così stimolate vanno incontro a una selezione clonale, con deregolazione del ciclo cellulare fino alla progressione tumorale. In questi casi la carica virale diminuisce, in quanto il DNA di HPV presente si trova prevalentemente in forma integrata nel genoma cellulare ed è in minima quantità [53]. La maggior parte degli studi di quantificazione virale hanno utilizzato metodi di *real time* PCR o il metodo semiquantitativo HC2.

Real time PCR

La real time PCR è una tecnica che consente la quantificazione del prodotto di PCR in tempo reale. La rivelazione e la quantificazione del DNA di HPV è possibile grazie alla registrazione del segnale di fluorescenza emesso da un fluorocromo, per cui il segnale aumenta proporzionalmente alla quantità di prodotto presente nella reazione. Tuttavia, la stima delle copie di DNA dipende dalla quantità di cellule presenti nel campione, per cui la rilevanza clinica della quantificazione virale può essere falsata dall'errore nella raccolta del campione citologico; infatti risulta difficile la valutazione della dimensione della lesione e della porzione di cellule infettate rispetto a quelle normali.

2.3.3 Metodi per la valutazione dell'integrazione virale

Durante l'integrazione virale, i geni E1 e/o E2 vengono spesso interrotti o deleti, svincolando dal loro controllo gli oncogeni virali E6 ed E7, determinando in tal modo la produzione incontrollata delle oncoproteine virali implicate nella patogenesi del carcinoma della cervice. La frequenza dell'integrazione virale sembra crescere con l'aumentare del grado della

lesione e quindi sembra correlare con la progressione del carcinoma. Tuttavia, l'importanza biologica dell'integrazione è ancora dibattuta, sia per l'impiego di metodiche non standardizzate, sia per la variabilità del sito di interruzione del DNA virale e, infine, per la coesistenza di genomi virali episomiali ed integrati nella stessa lesione.

Il metodo quantitativo in *real time* PCR è tra i metodi maggiormente impiegati nello studio dell'integrazione del DNA virale. Tale tecnica consente di amplificare e quantificare le copie delle regioni E1/E2 presenti nel campione, generalmente interrotte nell'integrazione, rispetto al numero di copie di regioni conservate, E6/E7. Il rapporto tra il numero di copie di E2 e quello di E6/E7 permette di stabilire lo stato fisico del DNA virale (episomiale, integrato o misto) [20].

2.3.4 Tecniche per l'analisi degli RNA messaggeri E6 ed E7

L'espressione degli oncogeni E6 ed E7 di HPV ad alto rischio oncogeno è essenziale per lo sviluppo del carcinoma squamocellulare invasivo. La tecnica NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) si basa sull'amplificazione isoterma del bersaglio ad RNA mediante l'impiego di 3 diversi enzimi: la trascrittasi inversa del virus della mieloblastosi aviaria (*AMV reverse transcriptase*), la T7 RNA polimerasi e la RNasi H. La specificità della reazione di amplificazione è dovuta all'impiego di due primer, di cui uno contenente la sequenza del promotore T7 riconosciuta dalla RNA polimerasi. Nella reazione di amplificazione si verifica l'accumulo di RNA a singola catena sintetizzati dalla T7 RNA polimerasi. In seguito si ha la sintesi del filamento complementare di DNA ad opera della trascrittasi inversa e la digestione del filamento complementare di RNA ad opera dell'enzima RNasi H. Il prodotto può essere rivelato mediante l'impiego di sonde specifiche marcate.

Attualmente esistono kit commerciali per la ricerca degli RNA di HPV che si avvalgono della tecnica NASBA per la ricerca dei messaggeri E6 ed E7. I test per identificare gli HPV mRNA E6/E7 esistenti in commercio sono di due tipi: il primo individua l'mRNA E6/E7 dei 5 tipi di HR-HPV più frequentemente riscontrati nelle lesioni intraepiteliali di alto grado e nei carcinomi invasivi (16, 18, 31, 33 e 45) [nomi commerciali: PreTect HPV-Proofer (NorChip); NucliSENS Easy Q HPV (bioMérieux)]; il secondo ha come target 14 tipi di HR-HPV [APTIMA HPV (Gen-Probe)].

2.4 HPV DNA test e HPV mRNA test a confronto

L'Hybrid Capture 2 (HC2) è l'HPV DNA test più utilizzato nel mondo per individuare il DNA virale. La sua maggiore accuratezza rispetto alla citologia ripetuta nel triage di donne con ASCUS nell'individuare le lesioni CIN2/3+ è riconosciuta in diversi studi [18, 54-57]. Tuttavia, la sua specificità è minore di quella della citologia ripetuta nel triage dell'LSIL per l'alta prevalenza dell'infezione da HPV [58, 59]. Restringendo il suo uso nel triage dell'LSIL alle donne di 35-60 anni, la sua specificità sembra invece aumentare raggiungendo in uno studio il 61% contro il 31% stimato nel gruppo d'età di 25-34 anni [60], anche se in un altro studio non supera il 30% nelle donne di oltre 50 anni [61]. La bassa specificità dell'HC2 nell'individuare le lesioni CIN2+/ CIN3+ nel triage di donne con citologia LSIL rispetto alle donne con citologia ASCUS è confermata in una metanalisi, pur rimanendo molto alta la sensibilità del test (> 90%) (Tab. 1) [18, 55, 56, 59].

PERFORMANCE DI HPV DNA TEST (HC2): METANALISI

APPLICAZIONE	OUTCOME	HC2	
		SENS	SPEC
Triage ASCUS	CIN2+	93.1%	62.3%
	CIN3+	95.5%	60.5%
Triage LSIL	CIN2+	97.2%	30.6%
	CIN3+	97.1%	26.1%

Da Cuzick et al., *Vaccine*, 2008

Tabella 1. Metanalisi sulla performance dell'HC2 nel triage di donne con citologia ASCUS e LSIL nell'individuare le lesioni CIN2+/ CIN3+ [18, 55, 56, 59]. SENS: sensibilità; SPEC: specificità [18].

Il crescente interesse per le indagini molecolari ha portato vari Autori a confrontare la performance dell'HPV DNA test e dei tipi di HPV mRNA test, valutandone l'accuratezza diagnostica nell'individuare le lesioni di alto grado.

Come emerge da una recente review sistematica, gli HPV mRNA test risultano dare meno risultati falsi positivi dell'HPV DNA test, con conseguente maggiore specificità. Il PreTect HPV-Proofer e l'Easy Q presentano una specificità maggiore e una sensibilità più bassa dell'APTIMA, che sembra simile più all'HPV DNA test, probabilmente per il diverso "cocktail" di genotipi che identificano (Tab. 2) [51].

ACCURATEZZA di HPV mRNA e DNA TEST

	SENS	SPEC	VPP	VPN
PreTect Proofer/ Easy Q	41-86%	63-97%	50-94%	48-99%
APTIMA	90-95%	42-61%	32-40%	96-97%
HPV DNA test	70-100%	28-56%	28-91%	56-100%

Dati di Burger et al., Gynecologic Oncology, 2011

Tabella 2. Accuratezza di HPV mRNA test (PreTect Proofer/Easy Q e Aptima) e HPV DNA test nell'identificare le lesioni di alto grado [51].

In una recentissima metanalisi, è stata confrontata l'accuratezza di APTIMA HPV con quella di HC2 test nell'individuare lesioni istologiche di alto grado nel triage di donne con citologia ASCUS o LSIL. L'HPV mRNA test ha presentato una sensibilità sovrapponibile a quella dell'HPV DNA test e una specificità sostanzialmente e significativamente maggiore per CIN2+ così come per CIN3+, in particolare nel triage dell'LSIL (Tab. 3) [54].

APTIMA E HC2 TEST A CONFRONTO					
PAP TEST	OUTCOME	APTIMA		HC2	
		SENS	SPEC	SENS	SPEC
ASCUS	CIN2+	95.7%	56.4%	93.8%	46.8%
	CIN3+	96.2%	54.9%	95.5%	44.9%
LSIL	CIN2+	91%	42.5%	95.5%	28.6%
	CIN3+	96.7%	38.7%	98.8%	27.8%

Arbyn et al., Int Journal of Cancer, 2013

Tabella 3. Sensibilità (SENS) e specificità (SPEC) di APTIMA e HC2 nell'individuare le lesioni CIN2+ e CIN3+ in donne con citologia ASCUS e LSIL [54].

Lie et al. hanno confrontato l'HPV mRNA test (PreTect HPV-Proofer) con l'HPV DNA test (HC2). HR-HPV sono stati rilevati nel 99.7% delle lesioni istologiche CIN2+: il DNA test è risultato positivo nel 95% dei casi contro il 77% dell'mRNA test. Tutti i carcinomi invasivi sono risultati mRNA positivi, mentre il DNA test è risultato più spesso positivo nelle lesioni benigne e di basso grado. Diverse ragioni potrebbero spiegare i differenti risultati dei due test, che hanno mostrato una concordanza del 72%. Innanzitutto, l'HPV DNA test non discrimina le infezioni attive da quelle latenti o transitorie. I casi DNA positivi e mRNA negativi, inoltre, potrebbero essere dovuti al diverso target di genotipi virali (13 versus 5, rispettivamente), anche se in realtà i 5 tipi individuati con l'mRNA test (16, 18, 31, 33 e 45) sono quelli predominanti nei carcinomi cervicali; oppure

potrebbero rappresentare dei falsi positivi, dovuti a cross-reattività con altri genotipi di HPV (6, 53, 55, 66, 70, 73 e 74). Inoltre, mentre il DNA test è risultato positivo più frequentemente nelle lesioni benigne e di basso grado, l'mRNA test invece è risultato maggiormente correlato al grado istologico delle lesioni, fornendo in tal modo maggiori informazioni prognostiche sulla valutazione del rischio (Figg. 1 e 2) [50].

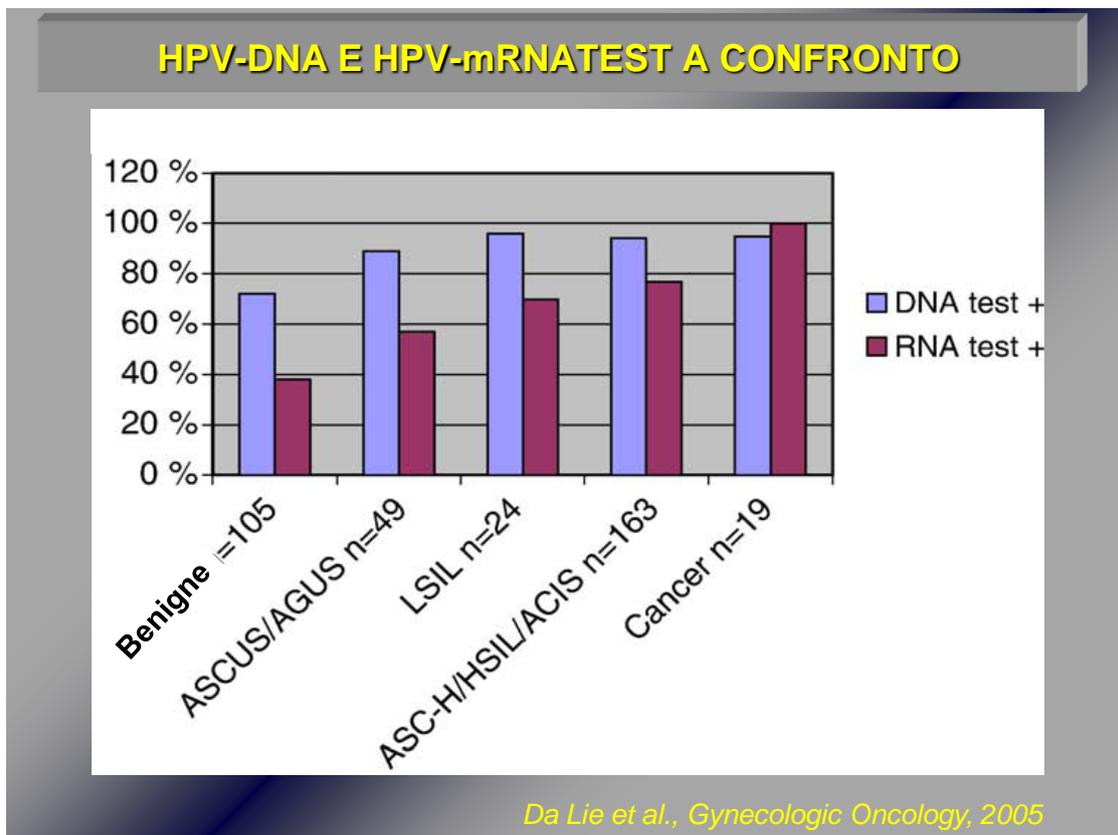
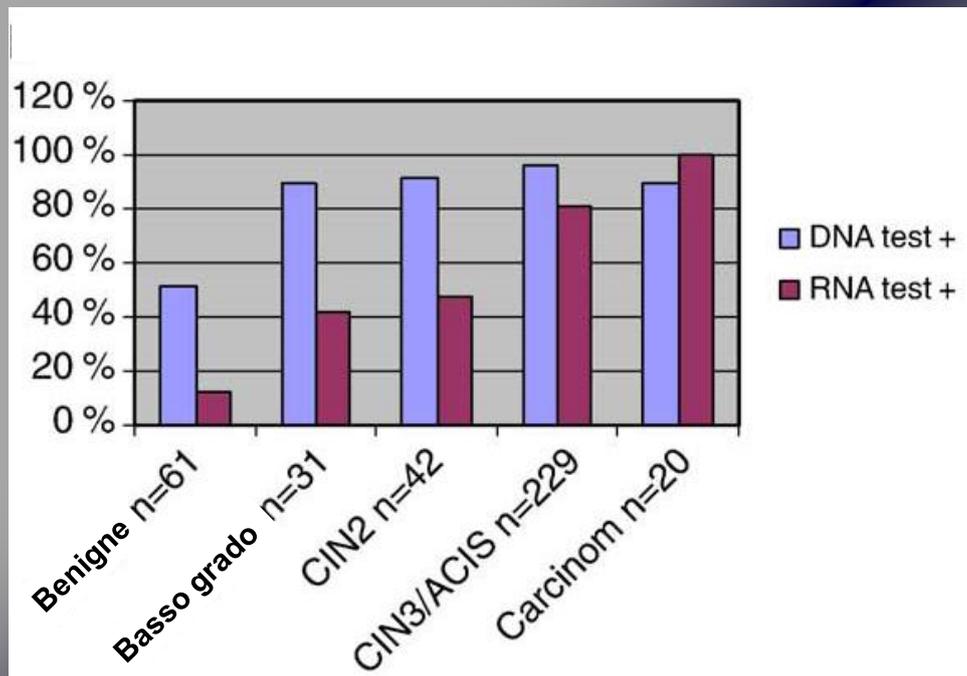


Figura 1. HPV test correlati alle diagnosi citologiche [50].

HPV-DNA E HPV-mRNATEST A CONFRONTO

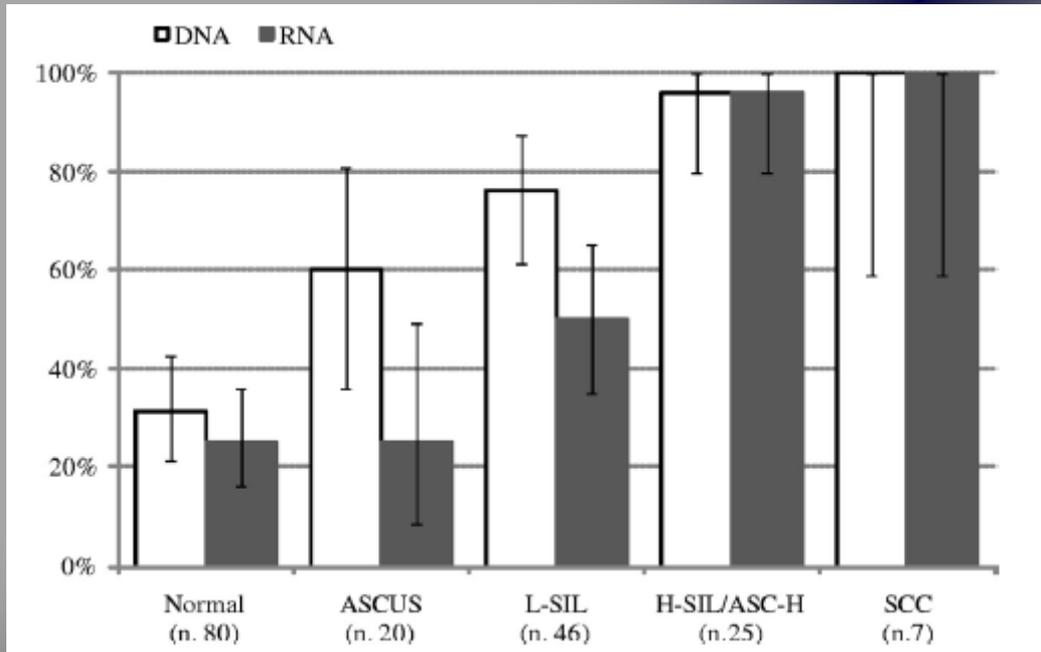


Da Lie et al., Gynecologic Oncology, 2005

Figura 2. HPV test correlati alle diagnosi istologiche [50].

In un altro studio [48], il DNA e l'mRNA test (HC2 e NucliSens EasyQ HPV, rispettivamente) sono risultati positivi rispettivamente nel 57.8% e nel 45%, con una concordanza abbastanza buona per le pazienti con citologia normale (81.3%) o di basso grado (69.6%), ma più bassa per le pazienti con ASCUS (55%). Nei casi di HSIL e SCC la concordanza è risultata maggiore, più precisamente del 92% e 100%, rispettivamente (Fig. 3). Quando sono stati considerati i risultati istologici, la concordanza tra i due test è risultata alta (91.7%) nei casi di esame istologico normale/benigno, abbastanza buona nei casi di CIN1 (72.2%) e CIN2 (72.2%), molto alta nelle pazienti con CIN3/CIS o SCC (100% e 90.9%, rispettivamente) (Fig. 4).

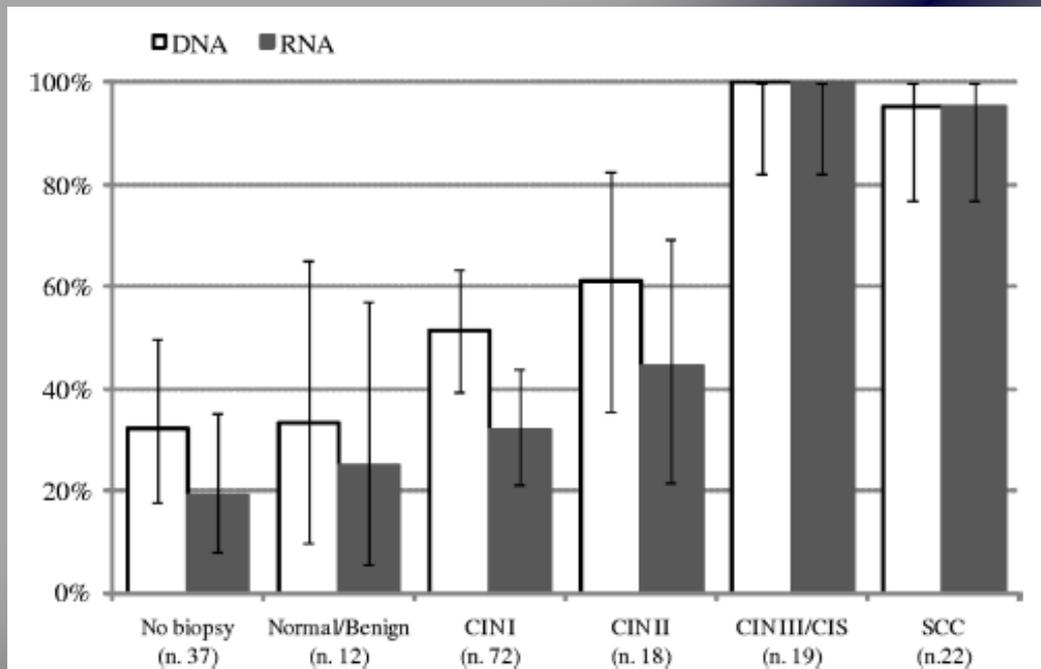
HPV-DNA E HPV-mRNATEST A CONFRONTO



Da Cattani et al., J. Clin. Microbiol., 2009

Figura 3. Prevalenza di risultati positivi per HPV DNA e RNA test in base alla citologia [48].

HPV-DNA E HPV-mRNATEST A CONFRONTO



Da Cattani et al., J. Clin. Microbiol., 2009

Figura 4. *Prevalenza di risultati positivi per HPV DNA test e RNA test in base all'istologia [48].*

La minore concordanza tra i due test nei casi normalità e di lesioni di basso grado è dovuta ai minori risultati positivi dell'HPV mRNA test. Questo, comunque, è un risultato atteso, verosimilmente non tanto per il diverso numero di genotipi di HR-HPV rilevati (13 per l'HC2 e 5 per l'EasyQ), quanto per il fatto che non tutte le infezioni da HR-HPV esprimono E6 ed E7, riflettendo la natura transitoria della maggior parte delle infezioni da HPV, di cui solo alcune producono lesioni precancerose. D'altra parte, il riscontro di mRNA E6 e E7 in una parte delle donne con citologia normale o con lesioni di basso grado indica che l'HR-HPV può essere attivo da un punto vista oncogenico, senza aver ancora prodotto lesioni rilevabili, e che gli mRNA E6/E7 potrebbero predire precocemente e in maniera sensibile un'infezione persistente e il rischio di displasia severa. Tuttavia, non si può escludere che le pazienti HPV DNA positive ma HPV mRNA negative non svilupperanno mai un cancro invasivo. Per questo sottogruppo di pazienti è ragionevole proseguire il follow-up, ma in maniera meno intensiva.

Nello studio, inoltre, entrambi i test hanno mostrato una sensibilità sovrapponibile, ma l'mRNA test è risultato più specifico (Tab. 4).

HPV DNA E HPV mRNATEST A CONFRONTO				
	SENS	SPEC	VPP	VPN
HSIL/SCC				
DNA test	96.9%	50.7%	30.1%	98.7%
mRNA test	96.9%	67.1%	39.2%	99.0%
CIN2+				
DNA test	86.4%	56.2%	49.0%	89.5%
mRNA test	81.4%	72.7%	59.3%	88.9%

Dati di Cattani et al., J. Clin. Microbiol., 2009

Tabella 4. Sensibilità (SENS), specificità (SPEC), valore predittivo positivo (VPP) e valore predittivo negativo (VPN) del DNA e dell'mRNA test nel predire le lesioni citologiche e istologiche di alto grado (CIN2+: CIN2, CIN3, CIS e SCC) [48].

Dunque, come suggeriscono i dati riportati in letteratura, l'mRNA test più che il DNA test ripetuto potrebbe individuare precocemente le infezioni persistenti a rischio di progressione maligna e quelle lesioni che sono destinate con molta probabilità a regredire.

La maggiore specificità dell'mRNA test rispetto al DNA test è stata confermata in ulteriori studi (Tab. 5 e 6) [62-64]. Benevolo et al. hanno riscontrato, inoltre, che quando usato come test di triage, l'mRNA test riduce l'indicazione alla colposcopia sia nei casi di ASCUS che di LSIL, a differenza del DNA test che presenta una maggiore accuratezza solo nel triage dell'ASCUS. Analogamente, l'mRNA test riduce l'invio alla colposcopia più della citologia anche quando utilizzato nel triage delle donne HPV DNA positive. Tuttavia, in considerazione della sua minore

sensibilità per CIN2+, è necessario comunque uno stretto follow-up per le donne HPV DNA positive/ mRNA negative [63].

HPV mRNA e DNA TEST A CONFRONTO				
	mRNA test		DNA test	
PAP TEST	SENS	SPEC	SENS	SPEC
ASCUS	83%	82%	99%	29%
LSIL	62%	76%	91%	13%
HSIL	67%	45%	96%	4%

Dati di Benevolo M et al., J Clin Microbiol, 2011

Tabella 5. Sensibilità e specificità di mRNA (PreTect HPV-Proof) e DNA test (HC2, PCR, o entrambi), stratificate in base alla categoria citologica, nell'identificare le lesioni CIN2+ [63].

Nello studio di Broccolo et al. [64] sono stati confrontati la misurazione della carica di DNA virale tramite PCR e l'espressione di E6/E7 mRNA di 5 tipi di HR-HPV, in considerazione del fatto che la carica virale e l'mRNA E6/E7 possono essere considerati dei markers surrogati di progressione maligna delle lesioni cervicali. La sensibilità e il VPN sono risultati più alti per il DNA test che per l'mRNA test (95% e 96% vs 77% e 88%, rispettivamente) nell'identificare le lesioni cervicali intraepiteliali di alto grado (CIN2+). Al contrario l'mRNA test è risultato più specifico e

con un VPP più alto (81.7% e 66.9% vs 58.6% e 52.5, rispettivamente) (Tab. 6).

La carica virale non sempre è risultata correlata all'espressione di E6/E7 [65]. Una possibile spiegazione sta nel fatto che l'integrazione del genoma virale in quello cellulare comporta una riduzione della replicazione virale, per cui in lesioni di alto grado la carica virale è relativamente bassa rispetto all'espressione di mRNA E6/E7 [64, 66]. D'altra parte, non tutte le donne HPV DNA positive sono anche mRNA positive, dal momento che non tutte le cellule infettate sono trascrizionalmente attive per l'espressione di E6/E7. Ciò potrebbe riflettere uno stato episomiale del virus con alta probabilità che l'infezione regredisca spontaneamente.

HPV DNA E mRNATEST A CONFRONTO				
	SENS	SPEC	VPP	VPN
CIN2+				
DNA test	95%	58.6%	52.5%	96%
mRNA test	77%	81.7%	66.9%	88%

Dati di Broccolo et al., J Med Virol, 2012

Tabella 6. Sensibilità, specificità, VPP, VPN di HPV DNA test (saggio quantitativo tipo-specifico real time PCR) e HPV mRNA test (PreTect HPV-Proofer test), nel predire le diagnosi istologiche di alto grado [64].

Come emerge da un altro recente studio in cui viene confrontata l'accuratezza dell'mRNA test con quella della citologia in base all'età, nelle donne di età ≥ 30 anni l'E6/E7 mRNA test presenta una sensibilità nell'individuare le lesioni CIN2+ e CIN3+ sovrapponibile alla citologia anormale, ma una specificità e un VPP più alti. Nelle donne più giovani di 30 anni, l'mRNA test è lievemente meno sensibile della citologia anormale per CIN2+, similmente sensibile per CIN3+, ma soprattutto mostra una specificità notevolmente maggiore (Tab. 7). Pertanto, come già evidenziato da altri studi, l'mRNA test potrebbe essere utile nel triage di ASCUS/LSIL anche nelle donne di età < 30 anni [67].

HPV mRNA test e Pap test a confronto					
Test	Outcome	≥ 30 aa		< 30 aa	
		SENS	SPEC	SENS	SPEC
mRNA test	CIN2+	89%	92%	88%	88%
	CIN3+	100%	82%	92%	81%
\geq ASCUS	CIN2+	89%	8%	96%	2%
	CIN3+	100%	10%	93%	2%

Pierry et al, Arch Pathol Lab Med. 2012

Tabella 7. Sensibilità e specificità dell'HPV mRNA test (OncoTect) e della citologia anormale [67].

Dunque, è disponibile in letteratura una consistente evidenza che indica che il triage con l'HPV DNA test (HC2) è più accurato (maggiore sensibilità e simile specificità) del Pap test ripetuto nella gestione delle donne con citologia border-line [18]. Gli mRNA test in generale sono risultati più specifici dell'HC2 ma meno sensibili nell'identificare le donne a rischio di CIN2+ [68]. In particolare, l'APTIMA test sembra invece mostrare, oltre che una specificità maggiore dell'HPV DNA test, una sensibilità sovrapponibile [69-71]. Nel triage delle pazienti con LSIL, mentre l'HC2 è più sensibile ma meno specifico della citologia ripetuta, APTIMA risulta più specifico con una sensibilità simile [70].

2.5 Follow-up post trattamento conservativo (escissionale) di neoplasia intraepiteliale cervicale

Per quanto riguarda la sorveglianza delle pazienti dopo trattamento di neoplasia cervicale intraepiteliale, lo status dei margini di resezione rappresenta sicuramente un importante indicatore di trattamento incompleto, con un rischio di persistenza della lesione di alto grado a un anno dal trattamento di oltre 11 volte maggiore nei casi con margini positivi [72]. Il rischio di recidiva delle lesioni CIN2+ (CIN2, CIN3, carcinoma in situ, adenocarcinoma in situ, carcinoma invasivo) rimane alto negli anni successivi al trattamento, in particolare in caso di infezione virale persistente per una media di 6 anni successivi [73]. In uno studio, il rischio di sviluppare una lesione CIN2+ a 5 e a 10 anni dopo il trattamento è stato stimato del 16.5% e 18.3%, rispettivamente, e dell'8.6% e del 9.2% per una lesione CIN3+, rispettivamente. Tale rischio si riduce al 2.9% e 5.2% per la CIN2+ e allo 0.7% per la CIN3+ sia a 5 che a 10 anni, in caso di 3 pap test negativi successivi (a 6, 12 e 24 mesi) al follow-up. Tale

rischio si abbassa ulteriormente all'1% e al 3.6% per CIN2+ e raggiunge lo 0% per CIN3+ in caso di negatività di Pap test e HR-HPV test combinati a 6 e 24 mesi [74].

Già da diversi anni è emerso il ruolo prognostico dell'HPV DNA test anche nel follow-up dopo trattamento conservativo per CIN [18, 75]. L'HPV DNA test, infatti, trova una potenziale applicazione nel predire il fallimento del trattamento, inteso come CIN residua o ricorrente, con una sensibilità del 94.4% (67-100%) e una specificità del 75% (44-100%) (sensibilità maggiore e specificità non significativamente più bassa del follow-up citologico) [18, 56, 70].

In uno studio, la PCR per i genotipi virali carcinogenetici e la combinazione del test virale con la citologia sono risultati più sensibili della citologia da sola. L'HC2 da solo non è risultato significativamente più sensibile della citologia. La specificità è stata abbastanza simile per la citologia e la PCR, ma più bassa per l'HC2 e i test combinati. La persistenza di HR-HPV ha mostrato una sensibilità simile ma una specificità significativamente più alta della citologia (Tab. 8) [76]. La persistenza degli HPV ad alto rischio rappresenta, infatti, un fattore di rischio di recidiva di CIN2+. In particolare, la persistenza genotipo-specifica di HPV, intesa come l'individuazione dello/gli stesso/i genotipo/i prima e dopo il trattamento, sembra correlare con il rischio di recidiva/malattia residua [77]. Una stratificazione del rischio, infatti, è stata osservata in base al genotipo di HPV riscontrato: come risulta dallo studio citato, la persistenza dell'HPV 16 determina un rischio di recidiva a 2 anni del 37%, il doppio di quello determinato dall'HPV 18 (18.5%), più del triplo di quello degli altri genotipi oncogeni (10.8%), e notevolmente più alto dei tipi non carcinogenici (1.5%) e del test negativo (0%) [76]. Tuttavia, il test positivo per l'HPV 16 non può essere usato come solo

strumento di sorveglianza post trattamento per la sua bassa sensibilità (59.4%), nonostante la sua alta specificità (90.5%) e il suo alto VPN (96.9%) [76].

PERFORMANCE DI TEST NEL F-U DOPO TRATTAMENTO				
	SENS	SPEC	VPP	VPN
ASCUS+	78.1%	69.1%	15.2%	97.8%
HC2	90.6%	63.8%	15%	99%
HPV PCR				
• HR-HPV	96.9%	67.1%	17.2%	99.7%
• HR-HPV persistente	77.4%	80%	21.6%	98%
HR-HPV + PAP TEST	96.9%	62.9%	15.6%	99.7%

Dati di Kreimer et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006

Tabella 8. Accuratezza stimata di test diagnostici nell'identificare una lesione CIN2+ nel follow-up (F-U) post trattamento[76].

In una review e metanalisi il VPN per malattia residua/ricorrente era del 98% per l'HR-HPV test, del 91% per i margini di resezione e del 93% per la citologia. Combinando il test virale con il Pap test, la sensibilità è risultata del 96%, la specificità dell'81%, il VPP del 46% e il VPN del 99%. Dunque, associando i due test, in caso di doppia negatività a 6 mesi dal trattamento, il controllo successivo potrebbe avvenire anziché a 12 mesi a 24 mesi [78].

In un'altra review sistematica e metanalisi più recente è stata valutata la performance di tre metodi di sorveglianza post trattamento nel predire una lesione di alto grado (CIN2+) confermata con l'istologia: la citologia, l'HR-HPV test e i due test insieme. Sono state riscontrate una sensibilità del 79% per la citologia, del 92% per l'HPV test e del 95% per i due test combinati e una specificità dell'81%, 76% e 67%, rispettivamente. Dunque, l'HPV test è più sensibile della citologia con una specificità sovrapponibile (Tab. 9) [79].

PERFORMANCE DI TEST NEL F-U DOPO TRATTAMENTO		
TEST DIAGNOSTICI	SENS	SPEC
CITOLOGIA	79%	81%
HR-HPV TEST	92%	76%
HR-HPV TEST + PAP TEST	95%	67%

Dati di Kocken et al., Gynecol Oncol. 2012

Tabella 9. Performance di tre metodi di sorveglianza post trattamento nel predire una lesione di alto grado (CIN2+) [79].

Il crescente interesse per le tecniche molecolari ha portato più di recente alcuni Autori a valutare il ruolo dell'mRNA test anche nel follow-up dopo

trattamento per CIN di alto grado. Se da un lato l'HPV DNA test è molto utile nell'identificare le infezioni da HPV, dall'altro solo una minoranza delle donne positive al test sviluppano una CIN2+. In considerazione del fatto che la persistenza dell'infezione da HR-HPV rappresenta la condizione necessaria per lo sviluppo del carcinoma [80], come più volte ripetuto, l'infezione tipo-specifica persistente è considerata il precursore delle lesioni neoplastiche, mentre l'espressione degli oncogeni E6/E7 è la condizione necessaria per la trasformazione maligna e per il mantenimento dello stato neoplastico [66, 81]. Sulla base di queste conoscenze, è stato suggerito che l'individuazione dei trascritti di HPV mRNA E6/E7 più che la rilevazione del DNA virale può essere un valido indicatore per identificare le donne più a rischio di sviluppare il carcinoma, non solo nello screening ma anche nella sorveglianza delle donne trattate.

Tropè et al. hanno individuato CIN2+ residuo al follow-up post trattamento nel 6.4% dei casi, di cui il 54.5% aveva margini di resezione positivi, il 63.6% aveva un Pap test anormale, il 95.5% un HR-HPV DNA test positivo, ma solo il 45.5% aveva l'mRNA test positivo a 6 mesi. In questo studio, l'mRNA test (PreTect HPV Proofer) ha mostrato un'alta specificità (95%) e un alto VPN (96.2%), ma inaspettatamente ha presentato una bassa sensibilità (45.5%) e un basso VPP (38.5%). Ciò potrebbe dipendere da una bassa carica virale o da una scarsa attività trascrizionale oncogenica di nuove infezioni. Dunque, le lesioni di alto grado nel follow-up potrebbero anche essere delle recidive più che delle lesioni residue, anche se in realtà il breve tempo intercorso fa propendere più per malattia residua. D'altra parte, le donne mRNA negative, in cui è rilevato un tipo di HPV incluso nell'mRNA test, potrebbero avere delle lesioni senza espressione oncogenica e dunque più propense a regredire spontaneamente. A ogni modo, dal momento che nel follow-up la sensibilità e il VPN sono ritenuti

più importanti della specificità e del VPP, in considerazione della sua bassa sensibilità, gli Autori concludono che l'mRNA test a 6 mesi dopo un trattamento escissionale non fornisce alcun contributo alla citologia nell'individuare una lesione residua CIN2+. Invece, la combinazione di citologia e HPV DNA test sembra al momento la strategia di scelta per il follow-up a breve termine [82].

Gli studi degli ultimi anni hanno, dunque, dimostrato l'utilità dell'HPV DNA test nell'individuare le lesioni di alto grado e i carcinomi invasivi, e il suo utile contributo in tal senso al triage di donne con citologia border-line e al follow-up dopo trattamento. Tuttavia, l'HPV DNA test è limitato da una bassa specificità per l'alta prevalenza di lesioni transitorie e asintomatiche. L'identificazione delle lesioni persistenti che potrebbero provocare lesioni di alto grado richiede un ripetuto monitoraggio. Infatti, nel triage dell'LSIL l'HPV DNA test è più sensibile ma meno specifico della citologia. In tal caso, l'identificazione del DNA di HPV 16/18 o dell'mRNA di un limitato numero dei più comuni genotipi carcinogenici consentirebbe l'identificazione delle donne più a rischio per CIN3+, anche se le donne negative al test dovrebbero comunque essere sorvegliate per la sensibilità e il VPN più bassi di tali test con quelli a maggiore range di HR-HPV [70]. L'HPV DNA test è stato proposto anche come test di screening primario delle donne di età ≥ 30 anni con un intervallo di screening di 5 anni in caso di test negativo, mentre la citologia e la genotipizzazione per HPV 16/18 potrebbero essere usati come triage per le donne HPV positive [70].

L'mRNA test più che il DNA test ripetuto, invece, può individuare precocemente le infezioni persistenti a rischio di progressione maligna, consentendo l'identificazione di quelle lesioni che sono destinate con molta probabilità a regredire, come suggeriscono i dati riportati in letteratura.

Tuttavia, gli studi condotti in questa direzione sono ancora pochi, soprattutto nella sorveglianza delle donne trattate. Se questi dati ancora preliminari troveranno conferma e saranno validati in numerosi altri studi futuri, il ruolo dell'mRNA test nel triage delle pazienti con citologia anormale e nel follow-up delle pazienti trattate per lesioni neoplastiche sarà confermato, riducendo l'afflusso di pazienti agli ambulatori di colposcopia, migliorando la compliance e il benessere delle pazienti, con significativa riduzione dei costi.

Capitolo 3

Studio sperimentale

3.1 Introduzione

Come ampiamente riportato nei capitoli precedenti, l'infezione da Papillomavirus Humano (HPV) è una delle più frequenti infezioni trasmesse sessualmente, che coinvolge comunemente le adolescenti e le donne più giovani dopo l'inizio dell'attività sessuale. L'infezione persistente da Papillomavirus Humano (HPV) rappresenta la condizione necessaria per l'insorgenza del carcinoma cervicale, che è il secondo tumore più comune che colpisce le donne nel mondo, e in cui viene individuato DNA virale in oltre il 99.7% dei casi. La maggior parte degli oltre 100 genotipi virali identificati non sono correlati a tumori. Alcuni dei genotipi che mostrano tropismo per le mucose genitali sono classificati a basso rischio (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108) e altri ad alto rischio oncogeno (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82). In particolare, tra questi ultimi l'HPV16 e l'HPV18 sono individuati in circa il 70% dei casi di tumore cervicale. Sebbene il rischio di contrarre l'HPV nel corso della vita sia maggiore dell'80%, la maggior parte delle infezioni sono transitorie e regrediscono spontaneamente entro 1-2 anni, soprattutto nelle donne giovani, per cui la maggior parte delle donne con infezione da HR-HPV non svilupperà il tumore. L'infezione persistente da HR-HPV, invece, è potenzialmente responsabile di modificazioni cellulari a livello cervicale, di lesioni precancerose di basso e di alto grado, fino alle forme invasive. Fortunatamente, nella maggior parte dei casi l'insorgenza del cervico-carcinoma richiede anni o decenni dall'infezione. Come spiegato precedentemente, E6 ed E7 sono gli oncogeni virali la cui espressione

correla con il grado della lesione. Nelle lesioni di basso grado, infatti, il DNA virale è in forma episomiale ed E6/E7 sono espressi a bassi livelli; nelle lesioni di alto grado il DNA virale è più frequentemente integrato nei cromosomi della cellula ospite, gli oncogeni sono espressi ad alti livelli, con aumento della replicazione cellulare e possibile sviluppo di lesioni displastiche intraepiteliali che, in casi estremi, possono superare la membrana basale (trasformazione maligna). Dunque, la progressione delle lesioni HPV correlate è sostenuta da ceppi ad alto rischio oncogeno (in particolare HPV 16-18) e dipende principalmente dalla loro persistenza, dall'integrazione del DNA virale nel genoma cellulare e dall'espressione degli oncogeni E6 ed E7.

È evidente, dunque, che l'identificazione di un'infezione persistente da HPV consente una gestione più adeguata e mirata delle pazienti realmente a rischio. Come documentato in letteratura, l'HPV DNA test, nonostante la sua alta sensibilità e il suo valore predittivo negativo (VPN) che sfiora il 100%, risulta poco specifico nell'individuare le lesioni istologiche di alto grado, con un valore predittivo positivo (VPP) basso per l'alta prevalenza di infezioni da HPV transitorie, che non provocheranno lesioni cervicali. Pertanto, l'identificazione delle infezioni persistenti richiede un monitoraggio con HPV DNA test ripetuti.

L'HPV mRNA test consente, invece, di individuare gli RNA messaggeri (mRNA) di E6 ed E7, correlati allo sviluppo del cancro, come più volte ripetuto. La loro individuazione può consentire la distinzione delle infezioni da HPV transitorie, caratterizzate da una bassa espressione di E6/E7, da quelle persistenti, caratterizzate da un'elevata espressione di E6/E7, che può dunque essere considerata un indicatore di progressione verso la CIN e il carcinoma invasivo. L'HPV mRNA test, pertanto, può avere un valore prognostico più alto e può migliorare la specificità e il

valore predittivo positivo dell'HPV-DNA test sia nello screening che nella sorveglianza delle pazienti trattate conservativamente per CIN2/CIN3.

Grazie all'acquisizione di maggiori conoscenze sull'oncogenesi cervicale e sul ruolo dell'HPV, negli ultimi decenni si è assistito a un cambiamento nell'orientamento terapeutico delle lesioni preinvasive di alto grado. Attualmente, infatti, l'approccio chirurgico preferito è quello conservativo, che garantisca la radicalità oncologica e preservi l'integrità anatomico-funzionale della cervice, anche in considerazione del fatto che tali patologie interessano donne in età fertile prevalentemente nullipare o primipare. Tuttavia, nelle donne trattate conservativamente esiste un rischio di insuccesso del 15% (5-25%) [74-76, 78, 79, 83-85] dovuto a persistenza e/o recidiva della lesione o progressione verso il carcinoma invasivo, da eventuale lesione residua o per non corretta diagnosi precedente. Da qui scaturisce l'importanza di un adeguato follow-up e soprattutto la necessità della piena adesione delle pazienti a una stretta sorveglianza. I protocolli esistenti, sebbene non uniformi, si basano sulla citologia quale esame di riferimento nei controlli delle pazienti trattate per CIN, pur essendo un esame non altamente sensibile. È noto, infatti, che anche in assenza di anormalità citologiche, la persistenza dell'HR-HPV DNA a livello cervicale può indicare la presenza di una lesione di alto grado. Pertanto, l'individuazione di un'infezione persistente da HR-HPV consente una stratificazione del rischio, sottoponendo a una più stretta sorveglianza le pazienti maggiormente a rischio, dilazionando invece i controlli sulle altre pazienti. Tuttavia, nonostante la sua alta sensibilità, l'HR-HPV DNA test è poco specifico. In considerazione di queste osservazioni, potrebbe essere allora importante valutare, nelle donne che mostrano persistenza del DNA virale, la persistenza genotipo-specifica e l'espressione degli mRNA E6/E7

di HR-HPV, in quanto markers di rischio di persistenza/recidiva di malattia.

3.2 Obiettivi dello studio

Alla luce di quanto riportato, le finalità del nostro progetto sono:

1. valutare la prevalenza dei diversi genotipi di HPV in pazienti con diagnosi istologica di CIN2/3 nella Regione Emilia-Romagna;
2. valutare la persistenza dei diversi genotipi virali nel follow-up post trattamento;
3. valutare l'espressione degli oncogeni virali E6/E7 nel follow-up post trattamento;
4. valutare la persistenza genotipo-specifica e l'espressione degli oncogeni E6/E7 di HR-HPV come fattori di rischio di recidiva, persistenza o progressione di malattia;
5. verificare l'applicabilità di nuovi test diagnostici bio-molecolari nello screening del cervico-carcinoma al fine di ottimizzare: a) i protocolli diagnostici, b) gli intervalli di richiamo, c) l'adesione al follow-up dopo terapia conservativa della CIN 2-3.

3.3 Materiali e Metodi

Lo studio è stato condotto nell'ambito del secondo livello diagnostico e terapeutico dei programmi di screening organizzati della Regione Emilia-Romagna; in particolare sono state incluse donne aderenti allo screening di popolazione del cervico-carcinoma nelle Aziende USL di Bologna e Ferrara. Le indagini molecolari sono state eseguite presso la Sezione di Virologia Speciale dell'U.O. di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Bologna Policlinico S.Orsola-Malpighi.

I criteri di inclusione sono stati:

- Pap test di screening anormale e diagnosi di CIN2/3 su biopsia mirata,
- età compresa tra 25 e 65 anni,
- nessuna precedente diagnosi di neoplasia intraepiteliale cervicale o di carcinoma cervicale invasivo,
- nessun precedente trattamento di conizzazione / isterectomia,
- non stato di gravidanza.

Tutte le donne sono state informate sulle finalità e modalità dello studio. Al momento dell'arruolamento nel protocollo tutte le pazienti hanno firmato un apposito modulo di consenso informato. Tutte sono state sottoposte a trattamento chirurgico conservativo di escissione conica (conizzazione) elettrochirurgica con ansa diatermica (LEEP) di 20 mm di ampiezza e 12, 15 o 20 mm di profondità (Utah Medical Products, Midvale, Utah, USA). L'esame istologico sul cono cervicale ha permesso di stabilire la diagnosi istologica definitiva e di valutare l'interessamento dei margini del cono, definiti coinvolti se la distanza tra la lesione CIN e il margine di resezione era inferiore a 1 mm.

Al momento del trattamento escissionale (T0) ed ai controlli successivi a 6 (FU1), 12 (FU2), 18 (FU3) e 24 (FU4) mesi, sono stati effettuati dei prelievi citologici eso-endocervicali che sono stati raccolti in soluzione PreservCyt/ThinPrep Solution. I campioni sono stati inviati entro una settimana al laboratorio, per essere sottoposti a estrazione degli acidi nucleici totali (DNA e RNA) per la ricerca e la genotipizzazione del DNA virale, mediante amplificazione genica seguita da ibridazione con sonde genotipo-specifiche in grado di identificare la maggior parte dei genotipi di HPV della regione genitale [28 genotipi di HPV a rischio alto (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), basso (6, 11, 40, 43, 44, 54, 70) e non definito (69,71,74)]. Il metodo commerciale impiegato è l' INNO-LiPA HPV Genotyping Extra assay (Innogenetics). In

caso di positività ai genotipi 16, 18, 31, 33 e/o 45, si è proceduto ad analizzare l'espressione degli oncogeni virali E6 ed E7, ricercandone l'mRNA mediante metodo NucliSens EasyQ HPV assay (bioMérieux).

Ad ogni visita nel corso del follow-up, inoltre, le pazienti sono state esaminate mediante Pap test e colposcopia. L'esame colposcopico è stato eseguito utilizzando un colposcopio Zeiss OPM1F (Carl Zeiss, Jena, Germany) e applicando acido acetico e soluzione iodo-iodurata di Lugol. Le anomalie colposcopiche sono state classificate secondo la nomenclatura proposta dalla Federazione Internazionale per la Colposcopia e Patologia cervicale (IFCPC) in 3 gradi anomali crescenti per gravità: Zona di Trasformazione Anormale (AnTZ) di grado 1 (AnTZ1) e grado 2 (AnTZ2), o cancro. È stata valutata la visibilità o meno della giunzione squamo-colonnare e sono state effettuate biopsie mirate della portio e/o curettage endocervicale per guidare la diagnosi in caso di Pap test anormale o sospetta malattia residua/ricorrente alla colposcopia.

Le metodologie molecolari impiegate nello studio sono state l'estrazione degli acidi nucleici, la genotipizzazione di HPV e la tecnica NASBA per la valutazione dell'espressione di mRNA E6/E7 di HPV.

Estrazione degli acidi nucleici

Gli acidi nucleici totali sono stati estratti dal campione citologico mediante metodi automatizzati che impiegano particelle magnetiche. In pratica, i campioni citologici vengono miscelati con una soluzione di lisi contenente un agente caotropico (GuSCN). Il buffer di lisi disgrega cellule, virus, batteri o funghi presenti nel campione permettendo il rilascio degli acidi nucleici. Al campione così lisato viene aggiunta la silice magnetica, a cui gli acidi nucleici presenti si legano in condizioni di alta concentrazione di sali. Successivamente, gli acidi nucleici vengono rilasciati dalla silice e concentrati nel volume prescelto di buffer di eluizione. La silice magnetica

infine viene catturata sulla parete delle strip e l'eluato può essere utilizzato per le analisi molecolari (ricerca DNA e RNA).

Tecnica di genotipizzazione di HPV-DNA (INNO-LiPA genotyping extra assay)

Questo test rileva 28 diversi genotipi di HPV, di cui 18 ad alto rischio (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), 6 a basso rischio (6, 11, 40, 43, 44, 54, 70) e altri 3 HPV (69, 71, 74), e il gene HLA-DPB1 come controllo interno, simultaneamente in una singola reazione. La PCR è effettuata con primer SPF10 biotinilati specifici per molti genotipi di HPV (multiplex PCR). Il prodotto di amplificazione viene quindi denaturato e ibridato su una striscia di nitrocellulosa a cui sono adese diverse sonde genotipo-specifiche. L'ibrido è rivelato con una reazione colorimetrica. Il pattern di bande ottenuto viene analizzato con un software dedicato.

Tecnica NASBA per la valutazione dell'espressione di mRNA E6/E7 di HPV (NucliSens EasyQ HPV assay - bioMérieux)

Il metodo NASBA è un processo di amplificazione enzimatico che avviene in condizioni isotermiche. Due primer specifici per l'RNA target determinano la specificità della reazione. Prima dell'amplificazione, gli acidi nucleici devono essere estratti dal materiale in corso di esame. Dato che il prodotto principale dell'amplificazione di una reazione NASBA è un filamento singolo di RNA, gli amplificati possono essere facilmente identificati e caratterizzati. Sono stati descritti numerosi metodi di rilevazione dell'acido nucleico e nuovi processi di ibridazione. La rilevazione in *real time* permette processi simultanei di amplificazione e rilevazione degli acidi nucleici. L'RNA amplificato è rilevato in *real time* attraverso l'uso delle sonde "Molecular Beacons", che sono oligonucleotidi

a filamento singolo con una struttura definita a “stem-loop”. La parte “loop” contiene una sequenza complementare a quella all’acido nucleico anti-senso, mentre la parte “stem” è indipendente dal target e presenta una struttura a doppio filamento. Un braccio della parte lineare viene legato ad un marcatore fluorescente mentre il secondo braccio viene legato ad un quencher non fluorescente. In questo stato la sonda non produce fluorescenza poiché l’energia del marcatore fluorescente viene trasferita al quencher. Quando la parte “loop” della sonda “Molecular Beacon” si ibrida con il suo target, quest’ultima subisce un cambiamento conformazionale che dà luogo a una separazione fisica tra il fluoroforo e il quencher, e all’emissione dei fotoni della lunghezza d’onda specifica per il fluoroforo. L’intensità della fluorescenza in fase di ibridazione è legata alla concentrazione dell’RNA amplificato.

3.4 Risultati preliminari

Centonovantasette pazienti candidabili allo studio sono giunte alla nostra osservazione. Di queste, 168 (età media 37 anni) sono state selezionate e arruolate nello studio, mentre 29 (14.7%) sono state escluse in quanto non aderenti a tutti i criteri di inclusione. In tutte è stata valutata la prevalenza dell’HPV DNA al T0. Il 4.2% (7/168) è risultato HPV DNA negativo, mentre il 95.8% (161/168) era HPV DNA positivo. In 98/161 (60.9%) casi le infezioni erano singole, nelle restanti 63 pazienti (39.1%) le infezioni erano multiple. Complessivamente sono state individuate 249 infezioni da HPV. Nel grafico è riportata la prevalenza dei genotipi virali più frequentemente riscontrati al T0 (Fig. 1 e Tab. 1).

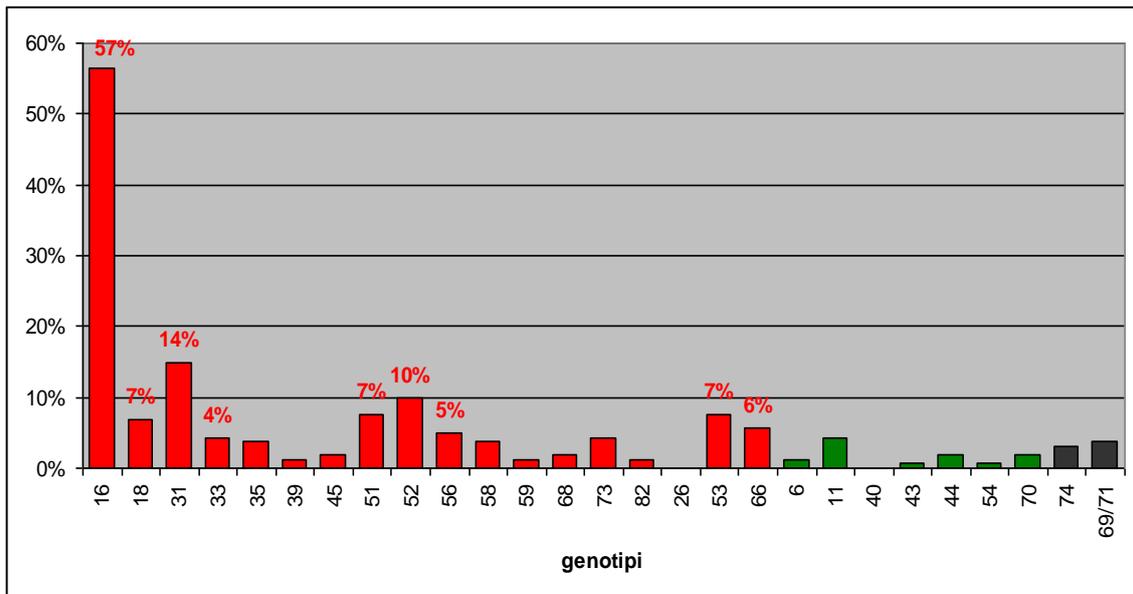


Figura 1. Prevalenza genotipi HPV in popolazione CIN2+

Genotipi virali	Prevalenza (%)
HPV 16	57
HPV 31	14
HPV 52	10
HPV 18	7
HPV 51	7
HPV 53	7
HPV 66	6
HPV 56	5
HPV 33	4

Tabella 1. Prevalenza dei genotipi HPV più rilevati.

Come riportato nella Figura 2, i genotipi 16 e 31 sono presenti prevalentemente come infezioni singole, mentre gli altri genotipi sono presenti soprattutto in infezioni multiple.

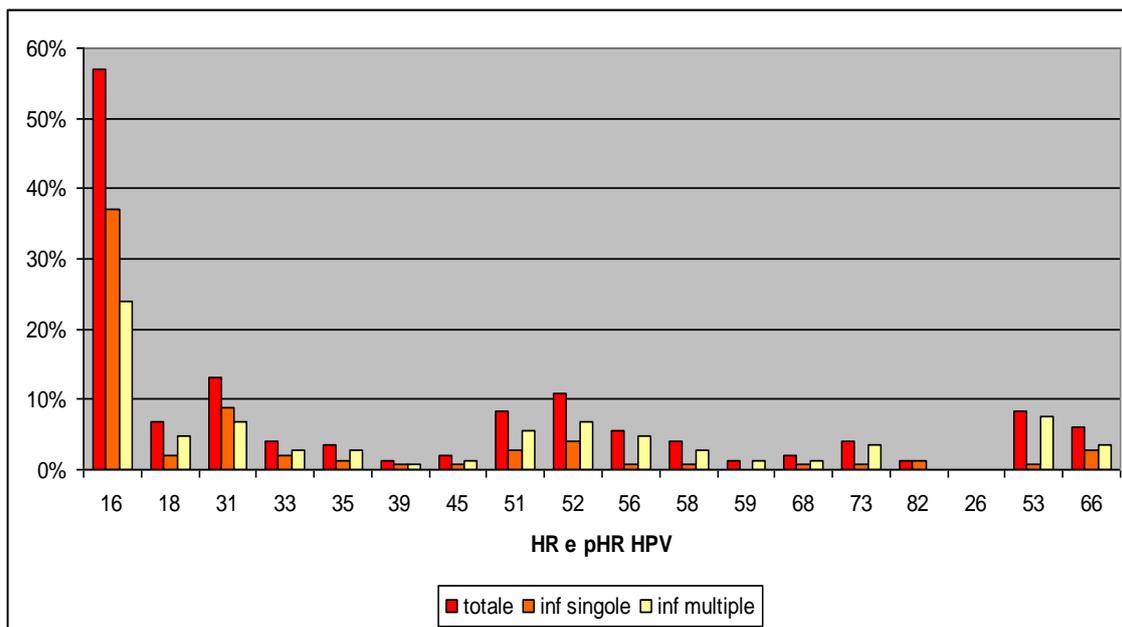


Figura 2. Infezioni da HR-HPV DNA singole o multiple in popolazione CIN2+.

Inoltre, non è emersa nessuna differenza significativa della prevalenza di HPV 16/18 per classi d'età (Fig. 3).

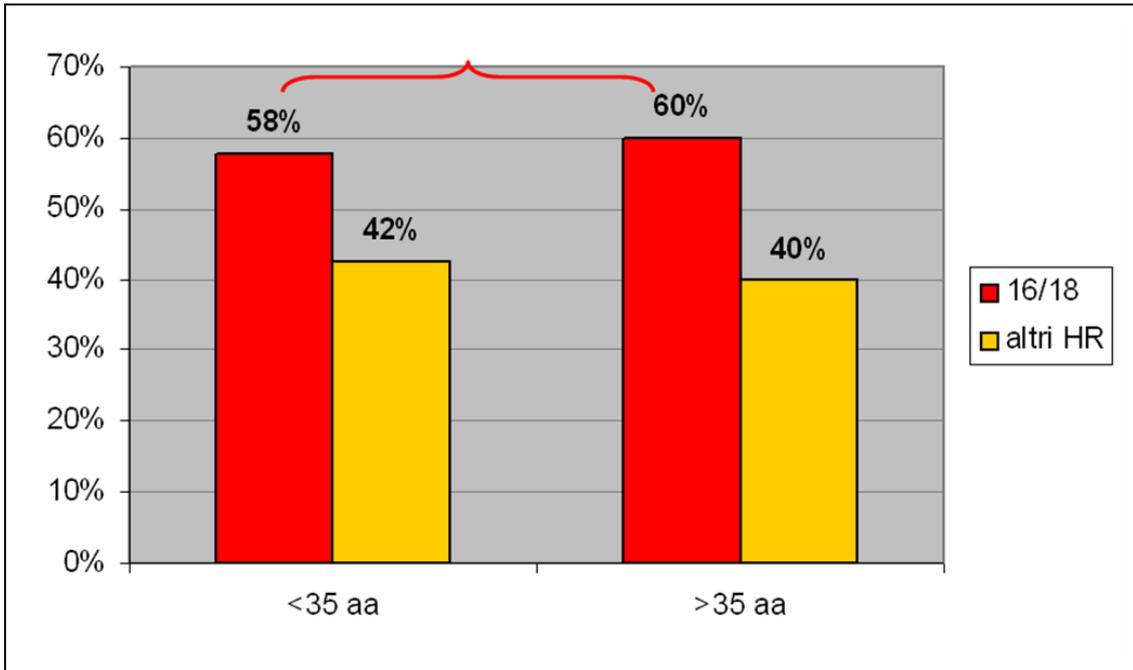


Figura 3. Prevalenza HPV 16/18 e HR-HPV per classi di età.

I casi di positività al DNA dei genotipi 16, 18, 31, 33 e 45 sono stati 124/161, per i quali è stata utilizzata successivamente metodica NASBA per ricercare gli mRNA E6/E7. Il 94.3% delle pazienti (117/124) sono risultate HPV mRNA positive (Fig. 4). Il mancato riscontro degli mRNA nei restanti 7 casi HPV DNA positivi è probabilmente riconducibile ad una minore sensibilità della metodica per gli mRNA.

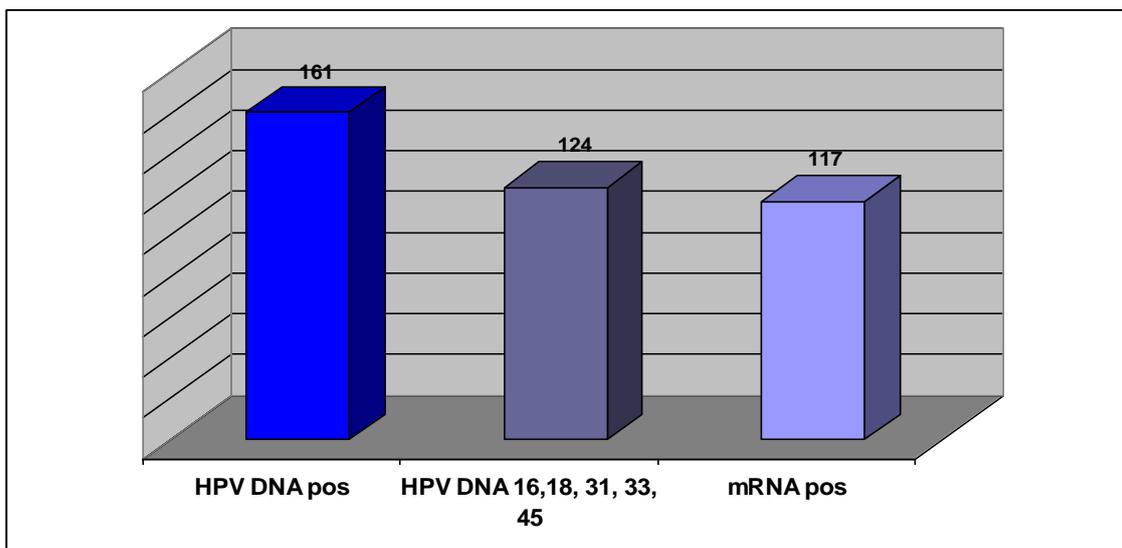


Figura 4. Popolazione CIN2+ (161 HPV pos/168 tot): positività a DNA e mRNA HPV test.

Il periodo di sorveglianza previsto nel progetto di ricerca è di 24 mesi ma al momento sono disponibili i dati preliminari relativi a 3 visite di follow-up (a 6, 12 e 18 mesi). Abbiamo avuto un drop-out di 38/168 pazienti (22.3%), per cui le donne al momento arruolate sono 130. Tutte le 130 pazienti hanno completato il 2° follow-up, il 95% è arrivato al 3° follow-up e il 35% ha concluso il periodo di sorveglianza. Ad ogni controllo, oltre al Pap test e alla colposcopia, è stato eseguito un prelievo citologico esocervicale per l'esecuzione dei test molecolari.

Al 3° follow-up abbiamo osservato una persistenza globale dell'HPV DNA di qualsiasi genotipo, compresi i LR-HPV e le nuove infezioni, del 46%, una persistenza dell'HPV DNA dei 5 genotipi 16, 18, 31, 33 e 45 del 39% con espressione di mRNA nel 21% (Fig. 5). I risultati preliminari a 24 (FU4) mesi relativi solo al 35% delle pazienti sono sovrapponibili a quelli ottenuti a 18 (FU3) mesi.

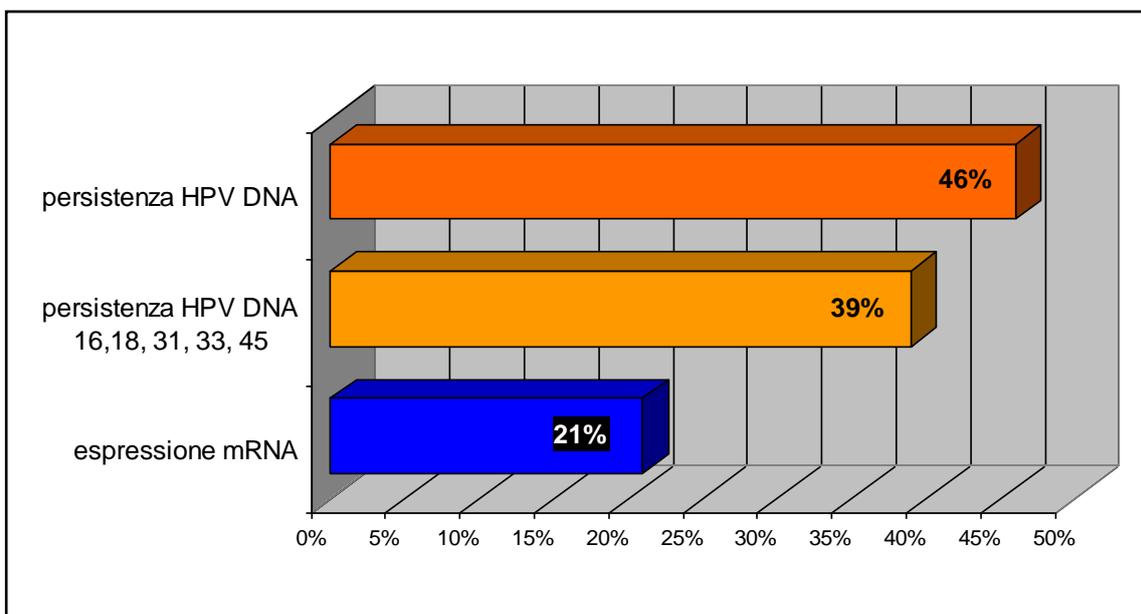


Figura 5. Persistenza virale ed espressione di mRNA al 3° FU

Al momento non è ancora possibile valutare l'importanza della persistenza virale e dell'espressione degli oncogeni nel follow-up delle pazienti trattate, al fine di limitare le recidive di malattia, in quanto sono disponibili solo i dati virologici e clinici relativi al FU a 12 mesi e, parziali, a 18 mesi. La persistenza/recidiva di malattia definitiva verrà dunque valutata dopo 24 mesi dal trattamento (studio in progress).

Ad oggi possiamo segnalare una recidiva di malattia (CIN2+) a 18 mesi del 10.8% (14/130 casi). È interessante osservare che in 4 casi il Pap test era negativo al FU. Tutte le pazienti erano HR-HPV DNA positive dal T0 al FU3. In 12/14 pazienti (9.2% del totale, 12/130) l'HPV DNA test era positivo per HPV 16, 18, 31, 33 e 45 dal T0 al FU3. Di queste 12 pazienti, 11 (91.7%) erano positive anche per mRNA E6/E7 dal T0 al FU3; l'unico caso negativo per mRNA era positivo al DNA di HPV 31 e 52 al T0, ma al FU è stata osservata la persistenza solo del DNA di HPV 52 e non 31. Negli altri 2/14 casi di recidive sono stati individuati i genotipi 52 e 58, per i quali non è disponibile il test per l'mRNA E6/E7.

3.5 Conclusioni

Le prevalenze dei diversi genotipi di HPV osservate nella popolazione della nostra Regione sono sovrapponibili a quelle riscontrate in altre popolazioni italiane ed europee. L'HPV 16 si conferma il genotipo prevalente nelle CIN2+ ed è generalmente da solo il responsabile della patologia (genotipo singolo).

Le nostre conclusioni al FU3 sono che l'HR-HPV DNA test (14 genotipi) è più sensibile della citologia e, inoltre, che l'mRNA test (5 genotipi) è più specifico nell'individuare una recidiva post trattamento.

Al termine del follow-up programmato (24 mesi), avremo i dati definitivi sulla persistenza dei diversi genotipi virali e sull'espressione degli oncogeni virali E6/E7 nel follow-up post trattamento. Inoltre, valuteremo l'impiego di tali test molecolari, singolarmente od in associazione, come markers precoci e oggettivi di persistenza/recidiva o progressione di malattia. Una volta elaborati i dati completi a 24 mesi, verificheremo la loro applicabilità nello screening del cervico-carcinoma al fine di ottimizzare i protocolli diagnostici, gli intervalli di richiamo, l'adesione al follow-up dopo terapia conservativa della CIN 2-3. Dunque, tali endpoint finali non possono essere disponibili finché non avremo terminato il follow-up.

BIBLIOGRAFIA

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12–19.
2. Bosch F. X., A. Lorincz, N. Munoz, et al. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.* 55:244–265.
3. Bosch F. X., and N. Munoz. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res.* 2002;89:183–190.
4. IARC Working Group. IARC Monographs on the Evaluation Of Carcinogenic Risks to Humans: Human Papillomaviruses. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 1995:64.
5. Report on Carcinogens. 11th ed. US Department of Health and Human Services, Public Health Services, National Toxicology Program:2004.
6. Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol.* 2005;6:204.
7. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324:17–27.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV Infection - CDC Fact Sheet. Incidence, Prevalence, and Cost of Sexually Transmitted Infections in the United States. February 2013.
9. Frazer IH, Cox JT, Mayeaux EJ Jr, et al. Advances in prevention of cervical cancer and other human papillomavirus-related diseases. *Pediatr Infect Dis J.* 2006 Feb;25(2 Suppl):S65-81, quiz S82.
10. Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health.* 2004 Jan-Feb;36(1):6-10.

11. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;31:14-19.
12. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997 May 5;102(5A):3-8.
13. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Mar 15;92(6):464-74.
14. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA.* 2001;285:2995–3002.
15. Ault Kevin A. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006;2006 Suppl:40470.
16. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* 2005 Jun 1;191(11):1808-16. Epub 2005 May 2.
17. Munoz 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.
18. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine.* 2008 Aug 19;26 Suppl 10:K29-41. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.06.019.
19. Syrjänen KJ, Biological behavior of cervical intraepithelial neoplasia. In: Franco E, Monsonego J. eds, *New Developments in cervical Cancer*

- Screening and Prevention, Blackwell Science, Oxford, 1997, pagg. 93-108.
20. Costa S et al., Gestione delle pazienti con pap test anormale, Vol. 1, 2005.
21. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114Y9.
22. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342–350.
23. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2004;68(2):362–372.
24. Ronco G, Ghisetti V, Segnan N, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy. *Eur J Cancer*. 2005 Jan;41(2):297-305.
25. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, et al. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*. 2003;157:218–226.
26. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12:485–490.
27. Woodman CB, Collins S, Winter H, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal color study. *Lancet*. 2001;357:1831–1836.
28. Ley C, Bauer HM, Reingold A, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83:997–1003.

29. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med* 2002;346:1105–12.
30. Manhart LE, Koutsky LA. Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis* 2002;29:725–35.
31. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S1-15.
32. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999;180:1415–1423.
33. Kjaer SK, Svare EI, Worm AM, et al. Human papillomavirus infection in Danish female sex workers. Decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity. *Sex Transm Dis* 2000;27(8):438–45.
34. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Jul;7(7):453-9.
35. Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, et al. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2008 Jul 15;168(2):123-37. doi: 10.1093/aje/kwn036. Epub 2008 May 15.
36. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women *Lancet*. 2004;364: 1678–1683.

37. Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, et al. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 1998 Oct;92(4 Pt 2):727-35.
38. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* 1993 Apr;12(2):186-92.
39. Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *The Journal of Infectious Diseases.* 2005;191(5):731–738.
40. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *Journal of the National Cancer Institute.* 2005;97(14):1072–1079.
41. Anderson M, Jordan J, Morse A, et al. A text and atlas of integrated colposcopy. Chapman & Hall, London 1992.
42. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007;121:621–32.
43. Woodman CBJ. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007;7:11–22.
44. World Health Organization. Cervical cancer, human papillomavirus (HPV) and HPV vaccines: key points for policy-makers and health professionals; 2007. BURGER
45. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 1995;141:680–9
46. Nanda K, McCrory DC, Myers ER 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– 9.

47. Clary, K. M., J. F. Silverman, et al. Cytohistologic discrepancies: a means to improve pathology practice and patient outcomes. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002; 117:567–573.
48. Cattani P, Zannoni GF, Ricci C, et al. Clinical performance of human papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix. *J Clin Microbiol.* 2009 Dec;47(12):3895-901. doi: 10.1128/JCM.01275-09. Epub 2009 Oct 14.
49. Broccolo F, Fusetti L, Rosini S, et al. Comparison of oncogenic HPV type-specific viral DNA load and E6/E7 mRNA detection in cervical samples: results from a multicenter study. *J Med Virol.* 2013 Mar;85(3):472-82. doi: 10.1002/jmv.23487. Epub 2012 Dec 26.
50. Lie AK, Risberg B, Borge B, et al. DNA- versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2005 Jun;97(3):908-15. Epub 2005 Apr 15.
51. Burger EA, Kornør H, Klemp M, et al. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecol Oncol.* 2011 Mar;120(3):430-8. Doi: 10.1016 / j.ygyno.2010.11.013. Epub 2010 Dec 4.
52. Castle PE, Schiffman M, Burk RD, et al. Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Nov;11(11):1394-9.
53. Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar;40(3):886-91.
54. Arbyn M, Roelens J, Cuschieri K, et al. The APTIMA HPV assay versus the Hybrid Capture 2 test in triage of women with ASC-US or LSIL cervical cytology: a meta-analysis of the diagnostic accuracy. *Int J*

- Cancer. 2013 Jan 1;132(1):101-8. doi: 10.1002/ijc.27636. Epub 2012 Jun 13.
55. Arbyn M, Buntinx F, Van Ranst M, et al. 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;96:280–93.
56. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, et al. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine* 2006;24 (Suppl. 3): S78–S89.
57. ASCUS-LSIL Triage Study Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:1383–92.
58. ASCUS-LSIL Triage Study Group. A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:1393–400.
59. Arbyn M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, et al. Clinical utility of HPV DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN. An update of pooled evidence. *Gynecol Oncol* 2005;99 (Suppl. 3):7–11.
60. Ronco G, Cuzick J, Segnan N, et al. HPV triage for low grade (L-SIL) cytology is appropriate for women over 35 in mass cervical cancer screening using liquid based cytology. *Eur J Cancer* 2007; 43:476–80.
61. Castle PE, Fetterman B, Thomas CJ, et al. The age-specific relationships of abnormal cytology and human papillomavirus DNA results to the risk of cervical precancer and cancer. *Obstet Gynecol* 2010;116:76–84.
62. Benevolo M, Terrenato I, Mottolese M, et al. Diagnostic and prognostic validity of the human papillomavirus E6/E7 mRNA test in cervical

- cytological samples of HC2-positive patients. *Cancer Causes Control*. 2011 Jun;22(6):869-75. doi: 10.1007/s10552-011-9757-0. Epub 2011 Mar 19.
63. Benevolo M, Vocaturo A, Caraceni D, et al. Sensitivity, specificity, and clinical value of human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA assay as a triage test for cervical cytology and HPV DNA test. *J Clin Microbiol*. 2011 Jul;49(7):2643-50. doi: 10.1128/JCM.02570-10. Epub 2011 Apr 27.
64. Broccolo F, Fusetti L, Rosini S, et al. Comparison of oncogenic HPV type-specific viral DNA load and E6/E7 mRNA detection in cervical samples: Results from a multicenter study. *J Med Virol*. 2013 Mar;85(3):472-82. doi: 10.1002/jmv.23487. Epub 2012 Dec 26.
65. Andersson S, Hansson B, Norman I, et al. Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol*. 2006 Sep;29(3):705-11.
66. Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110:525–541.
67. Pierry D, Weiss G, Lack B, et al. Intracellular human papillomavirus E6, E7 mRNA quantification predicts CIN 2+ in cervical biopsies better than Papanicolaou screening for women regardless of age. *Arch Pathol Lab Med*. 2012 Aug;136(8):956-60. doi: 10.5858/arpa.2011-0180-OA.
68. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, et al. Clinical performance of the PreTect HPV-Proofer E6/E7 mRNA assay in comparison with that of the Hybrid Capture 2 test for identification of women at risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol*. 2010 Aug;48(8):2779-85. doi: 10.1128/JCM.00382-10. Epub 2010 Jun 23.
69. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, et al. Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but more specific at detecting

- cervical precancer and cancer. *J Clin Microbiol.* 2011 Feb;49(2):557-64. doi: 10.1128/JCM.02147-10. Epub 2010 Dec 8.
70. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine*, 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F88-99. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.095.
71. Waldstrom M, Ornskov D. Comparison of the clinical performance of an HPV mRNA test and an HPV DNA test in triage of atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US). *Cytopathology.* 2012 Dec;23(6):389-95. doi: 10.1111/j.1365-2303.2011.00923.x. Epub 2011 Sep 20.
72. Oliveira CA, Russomano FB, Gomes Júnior SC, et al. Risk of persistent high-grade squamous intraepithelial lesion after electrosurgical excisional treatment with positive margins: a meta-analysis. *Sao Paulo Med J.* 2012;130(2):119-25.
73. Kreimer AR, Schiffman M, Herrero R, et al. Long-term risk of recurrent cervical human papillomavirus infection and precancer and cancer following excisional treatment. *Int J Cancer.* 2012 Jul 1;131(1):211-8. doi: 10.1002/ijc.26349. Epub 2011 Aug 30.
74. Kocken M, Helmerhorst TJ, Berkhof J, et al. Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long-term multi-cohort study. *Lancet Oncol.* 2011 May;12(5):441-50. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70078-X.
75. Paraskevaidis E, Arbyn M, Sotiriadis A, et al. The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment for CIN: a systematic review of the literature. *Cancer Treat Rev.* 2004 Apr;30(2):205-11.
76. Kreimer AR, Guido RS, Solomon D, et al. Human papillomavirus testing following loop electrosurgical excision procedure identifies

- women at risk for post treatment cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 May;15(5):908-14.
77. Venturoli S, Ambretti S, Cricca M, et al. Correlation of high-risk human papillomavirus genotypes persistence and risk of residual or recurrent cervical disease after surgical treatment. *J Med Virol.* 2008 Aug;80(8):1434-40. doi: 10.1002/jmv.21198.
78. Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ, et al. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv.* 2004 Jul;59(7):543-53.
79. Kocken M, Uijterwaal MH, de Vries AL, et al. High-risk human papillomavirus testing versus cytology in predicting post-treatment disease in women treated for high-grade cervical disease: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2012 May;125(2):500-7. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.01.015. Epub 2012 Jan 18.
80. Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, et al. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. 2008 Jul 15;168(2):123-37. doi: 10.1093/aje/kwn036. Epub 2008 May 15.
81. Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 2002;325:572.
82. Tropé A, Jonassen CM, Sjøborg KD, et al. Role of high-risk human papillomavirus (HPV) mRNA testing in the prediction of residual disease after conisation for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2011 Nov;123(2):257-62. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.07.032. Epub 2011 Aug 12.

83. Melnikow J, McGahan C, Sawaya GF, et al. Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after treatment: long-term follow-up from the British Columbia Cohort Study. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 721–28.
84. Soutter WP, Sasieni P, Panoskaltsis T. Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2006; 118: 2048–55.
85. Prato B, Ghelardi A, Gadducci A, et al. Correlation of recurrence rates and times with posttreatment human papillomavirus status in patients treated with loop electrosurgical excision procedure conization for cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2008; 18: 90–94.