

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO - BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in Ginecologia Oncologica

XXII Ciclo



PREVALENZA E CARICA VIRALE  
DEI PAPILLOMAVIRUS UMANI  
NELLE LESIONI DISPLASTICHE CERVICALI

Relatore: Dott. Francesco BROCCOLO

Tesi di Dottorato di:

Annalisa VILLA

Anno Accademico 2008-2009

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO – BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in Ginecologia Oncologica (XXII ciclo)

## Prevalenza e carica virale dei Papillomavirus umani

### nelle lesioni displastiche cervicali

Relatore: Dott. Francesco BROCCOLO

Tesi di dottorato di:

Annalisa Villa

Anno Accademico 2008-2009

# INDICE

1. INTRODUZIONE	
1.1 Papillomavirus umano e tumore cervicale	pag 1
1.2 Diagnosi di infezione da papillomavirus umano	pag 5
1.3 Carica virale e stato clinico	pag 8
2. SCOPO DEL LAVORO	pag 11
3. MATERIALI E METODI	
3.1 Pazienti	pag 12
3.2 Citologia e istologia	pag 14
3.3 Processazione del campione	pag 15
3.4 La reazione a catena della PCR	pag 16
3.5 Real-Time PCR	pag 21
4. ANALISI STATISTICA	pag 23
5. RISULTATI	
5.1 Prevalenza dei diversi genotipi di HPV	pag 25
5.2 Infezione multipla da HPV	pag 26
5.3 Carica virale	pag. 27
6. DISCUSSIONE	pag 29
7. APPENDICE	pag 36
8. BIBLIOGRAFIA	pag 40

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 PAPPILLOMAVIRUS UMANO E TUMORE CERVICALE

Il tumore della cervice uterina è la seconda forma tumorale, dopo il cancro al seno, più diffusa nel mondo tra le donne al di sotto di 50 anni. Attualmente in Italia si stima che ci siano 3500 nuovi casi di carcinoma della cervice ed oltre 1500 decessi dovuti a questa neoplasia. L'eziologia venerea di questo tumore è stata sospettata da più di 150 anni, ma solo negli ultimi venti il virus responsabile, il papillomavirus umano (HPV), è stato identificato. L'infezione da HPV è la più diffusa infezione a trasmissione sessuale nel mondo occidentale, ed è causa necessaria, anche se non sufficiente del carcinoma del collo dell'utero. Studi condotti su biopsie di carcinomi cervicali provenienti da diversi paesi hanno dimostrato che la prevalenza dell'HPV DNA è stata del 99% (Walboomers 1999; Zur Hausen 2002; Bosch and Munoz 2002; Bosch 2002; Woodman 2007) ed il rischio relativo di questo tumore associato alla presenza di HPV negli studi caso-controllo è di circa 100.

In una meta-analisi di 10058 biopsie di carcinoma della cervice, provenienti da 85 studi condotti in tutti i continenti, i tipi di HPV identificati più di frequente sono stati, nell'ordine, HPV 16, 18, 45, 31, 33 e 58. Globalmente, circa i due terzi dei carcinomi della cervice erano associati a HPV 16 (51%) e HPV 18 (16%) (Clifford et al 2003; Munoz and Bosch 2003). Il tumore della cervice uterina è il primo tumore ad essere riconosciuto dall'OMS come totalmente riconducibile ad un'infezione: quella dei virus oncogeni HPV. La scoperta dell'HPV come uno dei più potenti cancerogeni umani, causa pressoché necessaria del carcinoma della cervice, costituisce la base razionale per nuove strategie di screening che utilizzano il rilevamento degli acidi nucleici di HPV per il management dei pazienti.

Recentemente è stato osservato che la prevalenza dell'infezione da HPV e la presenza di infezioni multiple sono superiori alle aspettative; è stato stimato che l'80% delle donne sessualmente attive contrae almeno una volta nella vita questa infezione. Le giovani donne possono contrarre l'infezione da HPV non appena divengono sessualmente attive; sono comuni le infezioni multiple e sequenziali con differenti tipi oncogeni di HPV. Solitamente le infezioni sono transienti (l'80% delle donne va incontro a clearance dell'infezione entro 2 anni) e clinicamente irrilevanti,

sebbene esse producano delle alterazioni citologiche temporanee che si risolvono spontaneamente. Fortunatamente soltanto in poche donne l'infezione da HPV è persistente e attiva (soltanto nel 10% l'infezione permane dopo 5 anni e diviene clinicamente rilevante con un aumentato rischio (superiore al 50%) di sviluppare lesioni precancerose o cancro della cervice (Schiffman 2007).

Oggi le infezioni da HPV sono monitorate principalmente attraverso HPV DNA test, ovvero tramite metodiche qualitative. I limiti associati a queste metodiche sono molteplici e, primo tra tutti, bisogna considerare il fatto che esse non possono distinguere un'infezione transiente da una persistente, considerata essere un precursore della progressione neoplastica (Wallin 1999; Kjaer 2002).

E' necessario quindi sviluppare un nuovo algoritmo che combini lo screening citologico con l'analisi degli acidi nucleici virali, al fine di ottimizzare il valore predittivo positivo e negativo per lo sviluppo della patologia. A questo proposito bisogna tenere in considerazione l'essenzialità di un'accurata genotipizzazione ai fini di un'adeguata classificazione delle pazienti nelle diverse classi di rischio; diversi studi pubblicati in letteratura hanno infatti dimostrato che le donne con infezione da HPV 16 e 18 hanno una maggiore probabilità di sviluppare una lesione

precancerosa cervicale ed un cancro rispetto alle donne con infezione da altri tipi oncogeni (Khan 2005; Castle 2005; Castellsague 2006). Inoltre preliminari evidenze suggeriscono che la presenza di più genotipi di HPV rifletta una ripetuta esposizione e possa essere correlata ad un aumentato rischio di progressione della patologia; a questo proposito sono state descritte infezioni da genotipi maligni di HPV (nell'8,1% delle donne con cancro e nel 13,9% dei controlli) che sono stati associati ad un maggior rischio di cancro cervicale rispetto all'infezione con un singolo genotipo (Munoz 2003 ). Infine, la persistenza di HPV, identificata come un importante fattore di rischio della patologia neoplastica, può essere inclusa negli algoritmi dei test clinici. Tuttavia risulta difficile rilevare la persistenza di HPV (se non con lo stesso follow-up della paziente) e per questo è stata recentemente proposta la carica virale come marker di replicazione ed indice di infezione persistente. (Ho 1998; Swan 1999; Sun 2002).

## 1.2 DIAGNOSI DI INFEZIONE DA PAPILOMAVIRUS UMANO

I test utilizzabili oggi per la ricerca e la tipizzazione del virus Papilloma sono molteplici ma essenzialmente basati su due metodiche molecolari:

- Hybrid Capture System II, utilizzando un mix di sonde a RNA
- Amplificazione degli acidi nucleici (PCR), utilizzando primers consensus e tipo specifici

Il test più diffuso commercialmente disponibile, approvato dall'FDA (Food and Drug Administration), è denominato Hybrid Capture II. E' un test che consente la simultanea determinazione di ceppi ad alto, medio e basso rischio oncogeno attraverso l'ibridazione in fase liquida del DNA virale eventualmente presente nel campione. Questo metodo utilizza miscele di sonde a RNA; sono disponibili due pool di sonde che riconoscono rispettivamente HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 (rischio medio-alto) e HPV 6, 11, 42, 43, 44 (basso rischio). I pool possono essere impiegati simultaneamente nel caso si desideri una diagnosi generica di infezione da HPV, o

singolarmente se la discriminante del livello del rischio oncogenico fosse determinante. Dopo la denaturazione del DNA virale eventualmente presente nel campione e il suo riconoscimento da parte della sonda a RNA, si crea un ibrido DNA-RNA che viene riconosciuto da un anticorpo specifico ed immobilizzato su un supporto solido (pozzetto della micro piastra di reazione). Il rilevamento della reazione avviene attraverso l'uso di un secondo anticorpo anti-ibrido coniugato con fosfatasi alcalina; successivamente viene aggiunto un substrato chemio luminescente che, al legame con la fosfatasi alcalina, è capace di emettere fluorescenza. Tale segnale luminoso è tanto più intenso tanto più DNA si lega alla sonda. Sebbene questo test non sia validato come test quantitativo, è stata recentemente mostrata una correlazione tra i valori ottenuti mediante un saggio quantitativo di real-time PCR e il test HCII per il genotipo 16 (Pretet 2004). Sono disponibili diversi test basati sulla PCR che utilizzano primers denominati consensus o generali i quali riconoscono regioni altamente conservate nella "open reading frame" (ORF) L1 dei genotipi maligni di HPV.

Una delle complicazioni dell'HCII è la bassa sensibilità analitica del test ( $2 \times 10^5$  copie/ml) e la tendenza a mostrare un certo grado di cross-reattività con HPV non rappresentati nel mix di sonde a RNA.

Per contro, i numerosi test basati sul metodo della PCR, presentano una variabilità inter-laboratorio in termini di sensibilità e specificità analitica. D'altra parte, la possibilità di disporre di differenti saggi di PCR che utilizzano primers differenti, permette di coprire un maggior spettro di genotipi maligni.

### 1.3 CARICA VIRALE E STATO CLINICO

In questi ultimi anni sono stati sviluppati numerosi saggi di real-time PCR per la quantificazione di genotipi maligni di HPV da campioni della cervice uterina.

Sebbene la maggior parte degli studi associno la progressione delle lesioni pre-cancerose e l'elevato rischio di cancro cervicale (CC) con l'aumento della carica

virale dei genotipi di HPV "high risk", altri sembrano non confermare questi dati. (Jofesson 2000; Lorinz 2002; Dalstein 2003; Munoz 2003; Moberg 2003, 2004, 2005). L'incongruità dei risultati potrebbe essere associata alla presenza di lesioni intra-epiteliali di basso grado (L-SIL) che condiziona la determinazione della carica virale HPV nelle pazienti con lesioni intra-epiteliali di alto grado (H-SIL) (Sherman 2003), ovvero alle diverse metodiche utilizzate, alla scelta dei target e alle diverse forme di DNA amplificato (episomale o integrato) o più semplicemente al diverso modo di esprimere la carica virale (valori normalizzati o valori assoluti) (Zerbini 2001; Moberg 2003; Castle 2005; Broccolo 2008). Inoltre rimane ancora da chiarire da stabilire quali siano i

“threshold” dei “viral load” per ciascun genotipo maligno di HPV che permetta di distinguere un’infezione transiente da un’infezione persistentemente attiva.

Recentemente è stato ipotizzato un modello in cui vengono presentati gli eventi temporali della carcinogenesi indotta da HPV. In questo modello gli autori suggeriscono che in seguito ad un’infezione da HPV maligno, il DNA virale che si trova all’inizio prevalentemente in forma episomale, si replica attivamente producendo un’alta carica virale che aumenterebbe la probabilità di integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite. Durante l’infezione persistente, la delezione di E1/E2, determina l’attivazione dei geni E6/E7 e quindi un incremento dei trascritti oncogeni. Si selezionano i cloni con l’HPV integrato (processo di immortalizzazione cellulare) e quindi una diminuzione della carica virale.

Diversi studi hanno infatti utilizzato test di PCR semiquantitativi per determinare la carica virale (Castle 2005); altri studi hanno valutato la carica virale mediante il test commerciale Hybrid Capture 2, il quale non è in grado di individuare il singolo tipo virale e calcola la carica in forma semiquantitativa tramite un gradiente di intensità di chemiluminescenza (Lorincz 2002; Sun 2002; Sherman 2003; Gravitt 2003).

Sebbene diversi studi abbiano utilizzato saggi di real-time PCR per la quantificazione di genotipi maligni di HPV, i risultati non possono essere confrontati perché l'accuratezza e la ripetibilità di queste metodiche non è stata validata. Inoltre la sensibilità dei test basati sulla PCR può variare in relazione ai primers utilizzati, alle condizioni della reazione, alla performance dell'enzima DNA polimerasi, allo spettro del DNA amplificato ed alla capacità di riconoscere siti multipli. L'integrazione del DNA virale e la conseguente perdita di sequenze nucleotidiche così come l'esistenza di varianti genomiche intra-tipo di HPV potrebbe ancora spiegare la discrepanza dei risultati. Per finire, alcuni test di PCR semiquantitativi non sono stati standardizzati per il numero di cellule presenti nel campione (Lorincz 2002; Dalstein 2003; Castle 2005), rendendo la valutazione inaffidabile.

C'è inoltre un grande interesse per l'utilizzo di test quantitativi genotipo-specifici negli studi epidemiologici al fine di determinare la prevalenza degli HPV oncogeni e la loro associazione con la progressione neoplastica. Gli studi di prevalenza potrebbero essere importanti anche per valutare in futuro, in conseguenza

all'introduzione della pratica della vaccinazione, gli eventuali "switch" dei tipi di HPV circolanti.

## 2. SCOPO DEL LAVORO

Con lo studio ci siamo proposti di valutare:

- La frequenza di ciascun genotipo maligno nella popolazione italiana.
- La carica virale cellulare (indice di replicazione virale) dei genotipi “high risk” (16, 18, 31, 33, 45, 58) mediante saggi di real-time PCR in campioni citologici cervicali positivi (ASCUS, L-SIL, H-SIL) e negativi.
- La relazione tra carica virale e status clinico (citologia cervicale)

Il desiderio è quello di individuare nella carica virale un marker che possa rivelarsi utile nel management clinico delle pazienti così da ridurre e razionalizzare la necessità di ripetute verifiche mediante esami colposcopici e citologici. L'introduzione di un marker indicativo di infezione persistente attiva potrebbe fornire utili indicazioni nel monitoraggio delle pazienti con citologia borderline, nel follow-up delle pazienti conizzate per lesioni intra-epiteliali di alto grado così come nei programmi di screening del carcinoma cervicale

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 PAZIENTI**

Lo studio è stato condotto su un totale di 597 pazienti arruolate presso gli ambulatori della divisione di ginecologia e ostetricia dell'ospedale San Gerardo di Monza nel periodo Febbraio 2005-Dicembre 2006. Quattrocentosettantadue sono state visitate presso l'ambulatorio di colposcopia in quanto riferite ad un secondo livello per pap test positivo: 105 per pap test con cellule squamose atipiche di significato indeterminato (ASCUS), 200 per pap test con lesioni squamose intra-epiteliali di basso grado (L-SIL), 152 con citologia positiva per lesioni squamose intra-epiteliali di alto grado e 15 con diagnosi di carcinoma cervicale (CC). L'età di queste pazienti andava dai 19 ai 76 anni (mediana 37). I 125 campioni cervicali con citologia negativa sono di pazienti afferite presso l'ambulatorio di ginecologia generale per un controllo di routine; l'età di questo secondo gruppo variava dai 20 ai 65 anni con una mediana di 50.

Sono state escluse dallo studio pazienti che fossero state sottoposte in passato a conizzazioni cervicali o ad isterectomia. Le pazienti che

accettavano di partecipare allo studio firmavano un consenso informato precedentemente approvato dal comitato etico dell'ospedale San Gerardo.

### 3.2 CITOLOGIA E ISTOLOGIA

Tutte le pazienti arruolate avevano effettuato un pap test durante il periodo di studio. Il pap test è stato classificato in base al Bethesda System 2001 e 5 sono le classi che sono state prese in considerazione: normale, ASCUS, L-SIL, H-SIL e carcinoma cervicale.

Le pazienti con pap test positivo, inviate alla colposcopia, venivano sottoposte a biopsia cervicale in tutti i casi di lesioni di alto grado (H-SIL e CC); nei casi di lesioni di basso grado-ASCUS il prelievo biotico per l'esame istologico veniva effettuato qualora l'esame colposcopio evidenziasse aree cervicali sospette per lesioni di alto grado (AnTZ 2).

### 3.3 PROCESSAZIONE DEL CAMPIONE

Il campionamento citologico cervicale veniva ottenuto strisciando nell'endocervice con movimento rotatorio un opportuno spazzolino (Cytobrusch, Digene Cervical Sampler, Digene Corp, Gaithersburg, MD) che successivamente veniva introdotto in un contenitore contenente un liquido di conservazione utilizzato per la citologia in fase liquida (PresercCyt; Cytic Corporation, Boxborough, MA). Dopo l'esame citologico, il campione veniva trasportato al laboratorio di microbiologia e virologia dove veniva centrifugato a 2000 rpm per 10 minuti e successivamente compattato in pellets cellulari conservati a -70°C prima di procedere con l'estrazione e l'identificazione del DNA virale. Il DNA veniva estratto utilizzando un kit commerciale (Macherey-Nagel Nucleospin robot 96 blood kit).

### 3.4 LA REAZIONE A CATENA DELLA PCR

La tecnica della reazione a catena della DNA polimerasi fu inventata nella metà dagli anni '80e, analogamente al sequenziamento del DNA, ha rivoluzionato la genetica molecolare. La PCR sfrutta alcune peculiarità della duplicazione del DNA: la DNA polimerasi impiega un DNA a singolo filamento come stampo per la sintesi di un nuovo filamento complementare. Questi stampi di DNA a singolo filamento possono essere prodotti semplicemente riscaldando il DNA a doppia elica a temperature vicine a quelle di ebollizione. Per innescare la sintesi, la DNA polimerasi necessita anche di una piccola regione di DNA a doppia elica; pertanto il punto di inizio della sintesi può essere specificato fornendo come innesco un oligonucleotide monofilamento, il primer, che si appaia allo stampo esattamente in quel punto. Per la PCR vengono scelti dei primer che fiancheggiano la regione di DNA che deve essere amplificata in modo tale che i nuovi filamenti di DNA che vengono sintetizzati a partire da ciascun primer si estendano fino alla posizione del primer del filamento opposto. Pertanto in ciascun filamento di DNA di nuova sintesi, vengono a generarsi nuovi siti cui si appaia il primer. Il miscuglio di reazione viene ancora

scaldato in modo da separare i filamenti originari da quelli di nuova sintesi che sono nuovamente disponibili per nuovi cicli di ibridazione. Il risultato netto di una PCR è che, al termine di n cicli, la miscela di reazione contiene un numero massimo teorico di molecole di DNA a doppia elica pari a  $2^n$ .

Ogni ciclo, consistente nella separazione del DNA a doppia elica mediante riscaldamento, nell'appaiamento dei filamenti singoli con i primers e nella sintesi di DNA da parte dell'enzima, viene ripetuto non più di 20-35 volte.

La PCR è una metodica estremamente sensibile che permette di generare un trilione di copie di DNA da una sequenza target; un corollario imprevisto e spiacevole di questo potere di amplificazione è rappresentato dall'incapacità della reazione di differenziare il DNA target dai prodotti delle precedenti reazioni di amplificazione o da altre molecole volatili che possono contaminare le soluzioni utilizzate e falsare i risultati.

#### TECNOLOGIA TAQMAN ABI PRISM 7900

Negli ultimi anni la quantificazione degli acidi nucleici tramite PCR sta vivendo una radicale trasformazione grazie all'introduzione di nuove tecnologie che combinano l'utilizzo di sonde fluoro geniche (TaqMan; Fret; Beacons; Scorpions) con strumenti di nuova concezione (ABI

PRISMM 5700, 7700, 7900) che consentono di amplificare e quantificare simultaneamente il DNA, misurando in tempo reale il segnale di fluorescenza generato dall'ibridazione di sonde specifiche con il DNA bersaglio. Questo segnale aumenta proporzionalmente alla quantità di prodotto di PCR presente nella reazione; registrando l'incremento di fluorescenza ad ogni ciclo, è possibile monitorare la reazione di amplificazione e, nella fase esponenziale, si può osservare il primo incremento di prodotti di PCR in relazione alla concentrazione iniziale di template. Tanto maggiore è la quantità di DNA template, quanto prima si registra un significativo incremento della fluorescenza al di sopra della linea di fondo; questo parametro viene definito ciclo soglia (Ct), ovvero ciclo in cui l'emissione di fluorescenza eccede la soglia fissata detta threshold.

In particolare il nostro interesse si è focalizzato sui sistemi di rilevamento del DNA che utilizzano la combinazione di sonde fluorescenti TaqMan e del "sequence detector" ABI PRISMM 7900. Questo saggio sfrutta l'attività 5'-endonucleasica dell'enzima Taq-polimerasi per digerire una sonda marcata alle estremità con due fluorocromi distinti, uno a funzione quencher ed uno a funzione reporter, liberando in tal modo il marcatore fluoro genico dall'azione inibente del quencher. Il marcatore

reporter è in genere una fluoresceina modificata posta all'estremità 5', mentre il marcatore quencher è una rodamina modificata posta all'estremità 3'. Quando la sonda è integra, in base alla legge di trasferimento dell'energia di Forster, la fluorescenza del quencher è l'unica ad essere efficientemente misurabile. Durante ogni ciclo di amplificazione della PCR, l'enzima Taq-Polimerasi, innescato specificatamente dai primers, duplica il DNA da rilevare e, con la sua attività 5'-esonucleasica, degrada la sonda ibridizzata separando i due fluoro cromi e rendendo così pienamente rilevabile l'emissione del reporter. Poiché, durante la PCR, ogni ciclo di duplicazione del DNA è accompagnato dalla liberazione di una molecola di reporter, la fluorescenza che si accumula nel campione in esame è in ogni momento proporzionale alla quantità di DNA amplificato. Lo strumento Abi PRISMM 7900 è in grado di rilevare ad ogni ciclo (real-time) il livello di fluorescenza presente in ogni campione emettendo un raggio laser ad ioni Argon eccitatorio e convogliando la fluorescenza emessa in risposta dai fluoro cromi ad uno spettrografo che è in grado di separare le componenti del reporter e del quencher. Un apposito programma di software "Sequence Detector System" (SDS) registra lo spettro di emissione di ogni singolo campione durante l'intera durata della reazione di PCR e converte la variazione di fluorescenza del reporter in una

rappresentazione grafica in tempo reale della cinetica di amplificazione. Il calcolo della quantità di DNA presente nei campioni in esame viene effettuata determinando il ciclo di amplificazione in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter (Ct) che separa i segnali di amplificazione specifici da quelli del rumore di fondo del sistema; una curva di riferimento costruita con i Ct di campioni standard (contenenti quantità note di DNA diluito serialmente) consente poi l'extrapolazione del contenuto di DNA presente nei campioni in esame.

Il ciclo soglia viene sempre individuato nella fase esponenziale della reazione di PCR: è importante sottolineare che in questa fase la concentrazione dei reagenti non è ancora limitante e gli elementi di variabilità sono pertanto ridotti al minimo.

E' infine degno di nota che questo sistema riduce al minimo i rischi di cross-contaminazione dei campioni in esame. Infine, di non trascurabile importanza, la possibilità di sintetizzare delle probes con differenti fluorocromi ormai disponibili in commercio consente di amplificare diversi target mediante PCR multiplex realizzate in "single tube" permettendo un notevole risparmio di tempo e una riduzione dei costi.

### 3.5 REAL-TIME PCR

In tutti i campioni si è provveduto ad utilizzare 4 saggi indipendenti “Real-time multiplex PCRs in single tube” per il rilevamento e la quantificazione del DNA dei 5 genotipi di HPV ad alta malignità: HPV 16, 31, 18 e/o 45, e 33(HPV 18 e 45 così come HPV 33-52-58-67 erano indistinguibili gli uni dagli altri). La strategia di utilizzare test combinati (sistemi multiplex per la tipizzazione e la quantificazione dei sottotipi 18-45 e 33-52-58-67) è stata scelta per minimizzare il numero di reazioni PCR. Il DNA target per i gruppi HPV 16, 18/45 e 33. è stato scelto all’interno della sequenza “open reading frame” (ORF) del gene E1, mentre per l’HPV 31 all’interno dell’E2 ORF. Le regioni E1 E2 sono altamente conservate nell’ambito delle diverse varianti di HPV.

Sonde e primers sono stati scelti al fine di evitare “mismatch” tra i diversi genotipi e le diverse varianti (Primer Express software Biosystem, Foster city, CA). Per l’amplificazione si è ricorsi alla tecnologia TaqMan ABI PRISM 7900 (7900 SDS; Applied Biosystems, Forster City, CA).

Un secondo test TaqMan specifico per differenziare HPV 18 e HPV 45 è stato utilizzato per i campioni positivi al primo test HPV 18/45; la sequenza target in questo caso è stata scelta all'interno del E6 ORF.

Il sistema è inoltre in grado di quantificare, oltre al HPV DNA, un gene di controllo interno presente in tutte le cellule umane (C verificare la presenza di eventuali inibitori presenti nell'estratto di DNA, sia per valutare la qualità del DNA (osservando le curve di amplificazione senza dover ricorrere a metodi tradizionali "timing consuming"), sia per normalizzare il numero di copie di DNA di HPV high risk. Campioni negativi o con poche copie (<10000) di CCR5 saranno esclusi dallo studio. E' importante selezionare con attenzione questo gene perché dal numero di copie del gene si deve poter estrapolare il numero di cellule estratte (in ciascuna cellula sono presenti due copie di CCR5 e quindi dividendo il numero delle copie per 2 si risale al numero delle cellule). Si potrebbe essere trattati in inganno utilizzando come normalizzatore degli pseudo geni come la B-actina (gene di riferimento molto utilizzato) le cui copie possono variare a seconda del tipo di cellula e da soggetto a soggetto.

#### 4. ANALISI STATISTICA

Il Cochran-Armitage Trend test è stato impiegato per evidenziare la correlazione tra percentuale di pazienti HPV-positivi e grado della lesione.

Il test X<sup>2</sup> è stato impiegato per analizzare il significato delle diverse percentuali di positività per HPV nel gruppo “controlli” rispetto al gruppo “casi”.

Ulteriori analisi statistiche sono state effettuate per valutare la differenza in termini di carica virale tra le donne con citologia negativa e le donne con citologia positiva, l’associazione tra carica virale e severità della lesione, l’associazione tra carica virale e rischio di sviluppare lesioni precancerose.

Per ogni donna è stata calcolata la carica virale totale, intesa come la somma delle cariche virali di ciascun genotipo presente.

L’associazione tra rischio di sviluppare lesioni precancerose e carica virale è stata determinata stimando il AOR (age adjusted ratios) con CI al 95% (confidence interval).

La carica virale è stata espressa come valore normalizzato ed è stata calcolata come segue:

$$VL = Cn HPV / Cn CCR5/2 \times 10^4 \text{ cellule}$$

Dove VL corrisponde al numero di copie di DNA virale per 10<sup>4</sup> cellule, Cn HPV è il numero di copie di DNA virale e Cn CCR5/2 è il numero di cellule.

## 5. RISULTATI

### 5.1 PREVALENZA DEI DIVERSI GENOTIPI DI HPV

Mediante il saggio PCR Real-time è stata valutata la frequenza dell'infezione HPV tipo-specifica nell'area geografica monzese. La positività ad uno o più degli otto genotipi studiati è stata evidenziata nel 26% (32/125) e nel 61% (288/472) delle pazienti con campioni citologici rispettivamente negativi e positivi.

Come atteso, la prevalenza dell'HPV nelle pazienti con pap test negativo è risultata significativamente più bassa che in quelle con pap test positivo ( $p < 0,005$ ) (TABELLA 1).

Nelle pazienti con citologia positiva, la prevalenza dell'HPV 16, 31, 18-45, 33 (comprendente 33-52,58,67) è stata rispettivamente del 24%, 23%, 12%, 1%, 29%.

La prevalenza dei diversi genotipi di HPV studiati aumenta con l'aumentare del grado della lesione (ASC-US, L-SIL, H-SIL, CC) eccetto che per il sottotipo HPV-33 ( $p \text{ trend} < 0,05$ ) (TABELLA1).

## 5.2 INFEZIONE MULTIPLA DA HPV

Il saggio PCR Real-time utilizzato ha permesso di rilevare la presenza di infezioni multiple che sono risultate significativamente più frequenti nelle pazienti con citologia positiva (102/472, 22%) rispetto a quelle con citologia negativa (8/125, 6%).

Nelle pazienti con citologia positiva, le infezioni sono risultate così distribuite: 39% degli ASC-US, 43% dei L-SIL, 35% degli H-SIL e 7% dei CC.

La prevalenza di ogni singolo genotipo di HPV nelle pazienti con citologia positiva e negativa è mostrata nella figura 1.

### 5.3 CARICA VIRALE

Come mostrato nella figura 2, il valore mediano della carica virale totale (considerati tutti gli HPV studiati) aumenta linearmente con il grado della lesione.

Analizzando la carica virale per ogni singolo genotipo si evidenzia come, per il sottotipo HPV-16 e HPV-31, la carica virale sia significativamente più alta nelle pazienti con CC rispetto a quelle con citologia negativa ( $p < 0,05$ ); al contrario, nessuna differenza è stata trovata per HPV-18 e HPV-45 (FIGURA 2). Parimenti, è stata evidenziata una significativa associazione tra carica virale e grado della lesione ( $\gamma$  0,49 e 0,41 rispettivamente); un'associazione meno significativa è stata trovata per HPV-18 e 33 ( $\gamma$  0,19 e 0,02 rispettivamente).

La stima dell' AOR (Age Adjusted Odds Ratio) tra carica virale e citologia è riportata nella tabella 2. L'analisi è stata effettuata sia valutando la carica virale di ogni singolo genotipo che considerando la carica virale totale.

Sia una bassa carica che un'alta carica virale sono associate al rischio di avere un pap test positivo. In particolare, se consideriamo la carica virale

totale,, il AOR nel caso di bassa e alta carica virale è stato rispettivamente di 2,7 e 2,6 per citologia ASC-US, 2,2 e 4,5 per citologia L-SIL, 4,0 e 14,6 per citologia H-SIL e 2,2 e 15,7 nel caso di CC (P-trend < 0,01).

Nel caso specifico di HPV-16, un'alta carica virale si è dimostrata strettamente associata al rischio di pap test positivo (ASC-US, L-SIL, H-SIL e CC) con un AOR che va da 4,1 a 45,4. ( $p < 0,05$ ). Ugualmente è stata evidenziata una stretta associazione tra elevata carica virale di HPV-18 e citologia H-SIL. Una associazione significativa è stata ancora evidenziata tra HPV-33 e citologia ASC-US e L-SIL.

## 6. DISCUSSIONE

La conoscenza dell'epidemiologia dell'infezione da HPV nelle diverse aree geografiche potrebbe risultare importante alla luce della recente introduzione del vaccino profilattico.

Ad oggi sono stati pubblicati pochi studi circa la prevalenza dei diversi genotipi di HPV "high risk" nelle regioni italiane; inoltre, i pochi studi pubblicati, hanno preso in considerazione regioni diverse da quella di "Monza e Brianza" che abbiamo considerato nel presente studio.

Diversi saggi PCR Real-Time per la quantificazione degli HPV oncogeni sono stati sviluppati utilizzando come probes e primers sequenze specifiche di HPV DNA. (Gravitt, 2003; Moberg 2003).

Recentemente Broccolo ha messo a punto quattro saggi PCR Real-Time per la quantificazione dei virus HPV 16, 18/45, 31 e 33 (comprendente 33, 52, 58 e 67)(Broccolo 2008); nello studio l'autore ha inoltre validato un secondo saggio PCR Real-Time per differenziare HPV 18 e 45 nei campioni positivi alla prima linea di screening per HPV 18/45.

Lo studio ha evidenziato come l'oncotipo HPV più comune sia l'HPV 16 (27,6% dei campioni positivi per HPV e 24,3% di tutti i

campioni citologici positivi) seguito dal 31 (25,9% dei campioni HPV positivi e 22,9% dei campioni citologici patologici).

Questi dati sono in linea con quanto già evidenziato da altri studi italiani condotti sia nel Nord Italia (De Francesco, 2005; Rasso, 2005; Ronco, 2005; Gargiulo, 2007) che nel Sud Italia (Tornesello, 2006; Capra, 2008; Del Prete, 2008) i quali hanno trovato l'HPV 16 (con percentuali che variano dal 21,9 al 31,6% delle donne HPV positive) e l'HPV 31 (con percentuali che vanno da 4,4 al 19,5%) come genotipi più comuni. Diversamente, altri studi condotti nel Nord Italia (Zerbini, 2001) e nel Sud Italia (Ammatuna, 2008), hanno evidenziato come, nelle donne sottoposte a screening citologico, l'HPV 16 è il genotipo più frequente seguito genotipi diversi dal 31. Questa differenza può essere in parte spiegata dalle varianti genotipiche descritte per alcuni sottotipi come il 31, che possono non essere identificati da test convenzionali diagnostici che utilizzano consensus primer nei saggi PCR.

Il test specifico per HPV 31 utilizzato nel presente studio potrebbe infatti aver consentito di riconoscere più varianti del medesimo genotipo e quindi determinare una più alta prevalenza per il genotipo 31. La differenza potrebbe ancora essere dovuta ai test differenti utilizzati, alla diversità di range d'età, alla diversa popolazione presa in esame (studi epidemiologici

condotti su donne asintomatiche o su pazienti con pap test positivi). Ancora, la diversa prevalenza potrebbe spiegare la distribuzione geografica degli HPV.

La prevalenza dell'HPV 16 va dal 17% nelle pazienti con L-SIL al 38% nelle pazienti con H-SIL, confermando il comportamento aggressivo di questo genotipo e il suo ruolo nello sviluppo del cancro cervicale (Zur Hausen, 2002; Munoz 2003; Gravitt 2003); altri genotipi mostrano un incremento in termini di prevalenza non significativo con il grado della lesione (Fig. 1). E' interessante notare il diverso comportamento dell'HPV 33 che è risultato più frequente nelle pazienti con pap test ASC-US (33%) rispetto alle pazienti con pap test H-SIL (26%), suggerendo un diverso comportamento oncogenico dei diversi tipi di HPV.

Il saggio PCR Real-Time ha consentito inoltre di determinare la presenza di infezioni multiple, sebbene questo dato possa essere sottostimato sia per l'esiguo numero di genotipi considerati sia per l'impossibilità a differenziare HPV differenti da parte di uno dei saggi utilizzati.

Infezioni multiple sono state rilevate rispettivamente nel 25%, 39%, 43%, 35% e 7% delle donne con citologia negativa, pap test ASC-US, L-SIL, H-SIL e CC. Questo potrebbe significare come le infezioni multiple

siano più frequenti nella fase iniziale della displasia cervicale, come già riportato da altri autori (Trottier, 2006; Gargiulo 2007). La prevalenza delle infezioni multiple da HPV 16, 18 e 31 aumenta con il grado della lesione, indicando come la co-infezione possa giocare un ruolo nei processi di carcinogenesi e trasformazione cellulare (Trottier, 2006); al contrario, gli HPV 33 e/o 52, 58 e 67 potrebbero non avere un potere oncogenico diretto ma potrebbero indurre una trasformazione cellulare quando presenti con altri HPV nelle infezioni.

La carica virale di HPV potrebbe essere considerata un marker per la progressione delle lesioni precancerose cervicali poiché un'alta carica virale potrebbe risultare da uno stato di attiva replicazione virale che potrebbe supportare la persistenza virale (Ylitalo, 2000). Diversi studi hanno riportato un aumento della carica virale con il progredire della severità della lesione cervicale (Josefsson, 2000; Moberg, 2004; Flores 2006); comunque l'uso della carica virale quale marker di progressione rimane controverso (Josefsson, 2000; Lorincz, 2002; Dalstein, 2003; Moberg, 2003; Munoz, 2003; Woodman, 2007).

Il presente studio ha mostrato una correlazione tra la carica virale e il grado della displasia cervicale; questa associazione si è rivelata statisticamente più significativa per HPV 16 e 31 rispetto agli altri genotipi.

I genotipo 16 e 31 hanno inoltre mostrato la più alta carica virale media (rispettivamente 4.384.799 e 4.134.984 copie/10<sup>4</sup> cellule). Questo potrebbe essere dovuto al diverso comportamento degli HPV e supporterebbe la tesi secondo cui la carica virale è un fattore di rischio per lo sviluppo del carcinoma cervicale. L'eterogeneità delle lesioni cervicali (H-SIL e L-SIL) e l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite con la conseguente perdita di alcune sequenze di acido nucleico potrebbe spiegare come alcune pazienti con H-SIL presentino una bassa carica virale.

Lo studio evidenzia ancora come il AOR per H-SIL nel percentile con la più alta carica virale sia più alto per HPV 16 e 18 (AOR uguale a 30 e 8 rispettivamente) che per HPV 31 e 33 (AOR uguale a 1,5 e 1,2 rispettivamente); ciò sta ad indicare come la carica virale rappresenti un fattore di rischio genotipo dipendente per lo sviluppo del carcinoma in situ (CIS) e del cancro cervicale. Ugualmente, il AOR per H-SIL calcolato per il valore mediano della carica virale aumenta con l'aumentare della carica virale totale e raggiunge un massimo di 14,6 per il percentile con la più alta carica virale ( $p < 0,01$ ). Lo studio ha dimostrato come alti livelli di HPV 31 e 33 potrebbero essere prognosticamente di minor rischio oncogenico per lo sviluppo di H-SIL (AOR uguale 1,57 e 1,26 rispettivamente) che per HPV 16 e 18 sebbene è stata trovata una forte associazione tra carica virale

di HPV 31 e severità della lesione. Questi dati potrebbero spiegare il diverso comportamento oncogenico – meno aggressivo- dei genotipi 31 e 33 rispetto agli HPV 16 e 18. E' necessario studiare il diverso comportamento dei differenti genotipi per poter confermare tale supposizione.

Generalmente l'infezione da HPV 33 produce un pattern di alterazioni cervicali diverse da quelle prodotte dagli altri genotipi. HPV 33 e/o 52, 58 e 67 infatti sono molto più frequentemente associati a lesioni L-SIL, mostrando solo un moderato aumento della carica virale e dell'associazione con altri genotipi con la progressione della lesione cervicale. Ulteriori studi, in grado di differenziare il genotipo 33 dal 52, 58 e 67 sono necessari per poter confermare tali affermazioni.

Il limite maggiore di questo studio è che si tratta di uno studio tipo "cross sectional" e quindi senza possibilità di investigare la natura dinamica dell'infezione da HPV e parametri tanto importanti come la persistenza, la regressione e la clearance. Studi longitudinali osservazionali sono necessari per chiarire la storia naturale dell'infezione da HPV e il ruolo di questi markers nella persistenza-progressione delle lesioni cervicali.

Stando a risultati dello studio, la carica virale di HPV 16 e 18 è strettamente correlata al grado della lesione cervicale. Il valore relativo ai genotipi HPV 16 e 18 così come la carica virale totale sono risultati più alti nelle lesioni H-SIL e nei CC rispetto alle lesioni L-SIL; la differenza tra i gruppi si è dimostrata statisticamente significativa. ( $p < 0,05$ ). Per concludere, la prevalenza dell'infezione da HPV aumenta progressivamente dalle donne con citologia normale alle donne con CC ( $p$  trend  $< 0,05$ ).

Per riassumere, la frequenza dell'infezione da HPV 31 (22,9% di tutti i campioni citologici patologici e 25,9% dei campioni HPV positivi) rilevata nella popolazione studiata è in assoluto la più alta sino ad ora pubblicata. A giudicare dai dati ottenuti, la carica virale di HPV potrebbe fornire informazioni circa il rischio futuro di sviluppare lesioni cancerose, ma ciò è strettamente dipendente dal genotipo di HPV.

In futuro, test affidabili in grado di tipizzare e quantificare la carica virale, potrebbero essere impiegati per la gestione delle pazienti con pap test positivo.

## 7. APPENDICE

TABLE I. Frequency of HPV-16, -18, -45, -31, -33, and/or 52, -58, -67 in Cervical Samples From Patients With Diagnosis of ASCUS, LSIL, HSIL, Cervical Carcinoma and Women With Normal Cytology

Diagnosis <sup>a</sup>	No. of patients	No. of cases of HPV-DNA positive for (%)					No. of patients positive for one or more genotypes (%)	<i>P</i> <sup>d</sup>
		HPV-16	HPV-18	HPV-31	HPV-45	HPV-33 group		
Normal	125	9 (7)	3 (2)	17 (14)	0 (0)	19 (15)	32 (26)	0.003
ASCUS	105	17 (16)	12 (11)	19 (18)	0 (0)	35 (33)	59 (56)	0.006
LSIL	200	34 (17)	22 (11)	47 (24)	2 (1)	57 (28)	99 (50)	0.006
HSIL	152	58 (38)	21 (14)	38 (25)	2 (1)	39 (26)	118 (78)	0.006
CC	15	6 (40)	0 (0)	4 (27)	1 (7)	3 (20)	12 (80)	0.006
<i>P</i> -value of Cochran-Armitage Trend test <sup>c</sup>		<0.0001	0.002	0.0060		0.1299	<0.0001 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup>ASCUS, atypical squamous cells of undetermined significance cells; L- or H-SIL, low- or high-grade squamous intraepithelial lesions; CC, cervical cancer.

<sup>b</sup>The presence of one or more HPV genotypes was significantly higher in patients with ASCUS, LSIL, HSIL, and CC as compared to women with normal cytology.

<sup>c</sup>If statistically significant, the Cochran-Armitage Trend test detects an increasing trend in proportion of HPV positive from Normal to CC.

<sup>d</sup> $\chi^2$  test was used to analyze the significance of the different HPV genotypes prevalence in cervical samples from patients and controls.

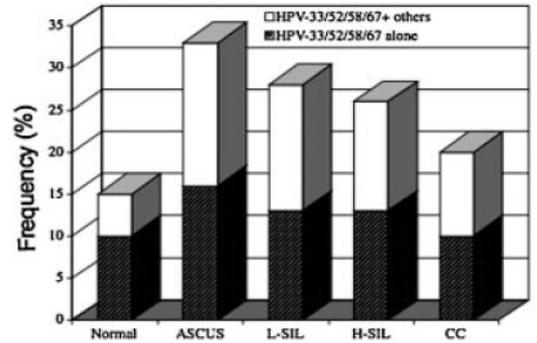
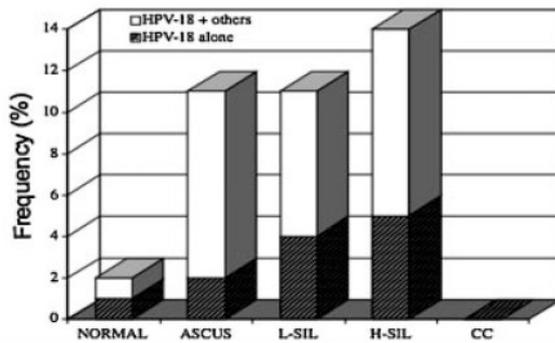
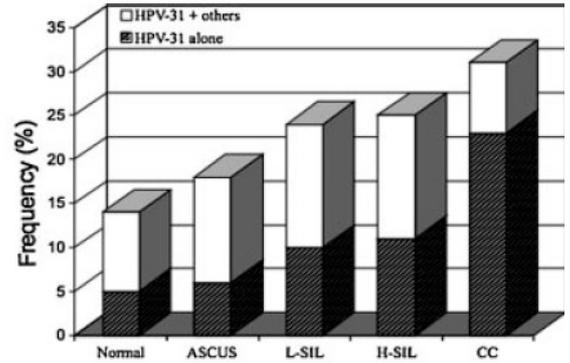
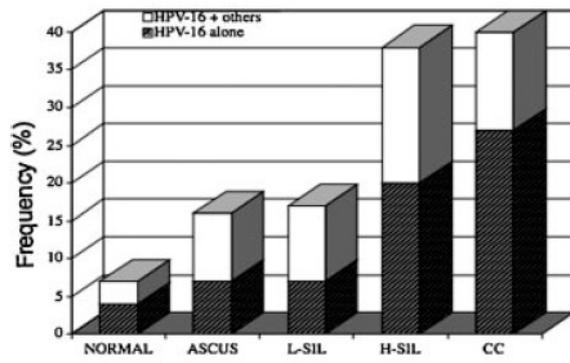


Fig. 1. Prevalence of oncogenic HPV alone and in combination with others genotypes.

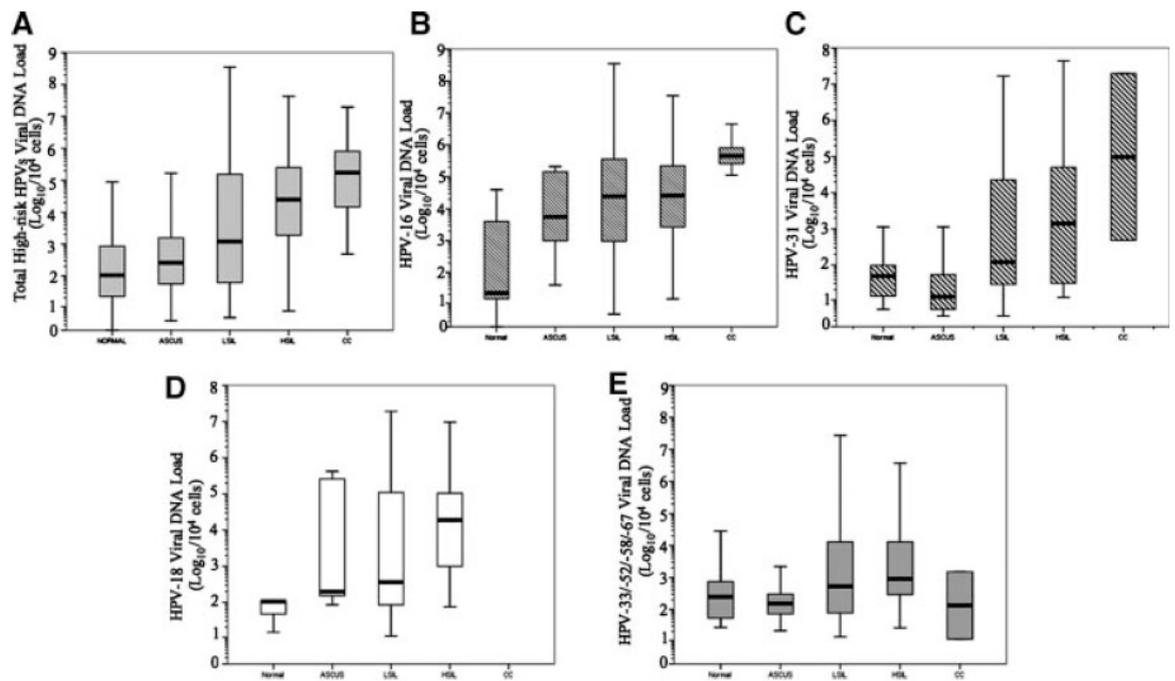


Fig. 2. Distribution of HPV viral load, according to the degree of cervical lesion or cytological finding (normal, ASCUS, L-SIL, H-SIL, and CC). Each box indicates the interquartile range. The lines that extend from each box indicate the extremes of values (whiskers represent the extreme values), and the line across each box indicates the median. The viral load was expressed in a log scale. A good association was showed between total oncogenic HPVs viral load and lesion degree ( $\gamma = 0.46$ ; **A**) as well as for HPV-16 ( $\gamma = 0.41$ ; **B**) and HPV-31 ( $\gamma = 0.49$ ; **C**); by contrast poor or none association was found for HPV18 or 45 ( $\gamma = 0.19$ ; **D**) and HPV-33 or 58 ( $\gamma = 0.02$ ; **E**).

Detection and Quantitation of High-Risk HPV Types

TABLE II. Age Adjusted Odds Ratios (95% CI) for ASCUS, LSIL, and HSIL in Relation to the Normalized HPV Viral Load of Individual HPV Types or Group of Closely Related HPV Types

Viral load of HPV types <sup>a</sup>	ASCUS			LSIL			HSIL			CC			
	Normal	n	AOR	95% CI	n	AOR	95% CI	n	AOR	95% CI	n	AOR	95% CI
<b>HPV-16</b>													
Negative	116	88	1.0		166	1.0		94	1.0		9	1.0	
Low (1-3,072)	7	12	2.60	0.91-7.45	21	2.6	0.94-7.04	21	3.95	1.39-11.24	1	1.94	0.16-23.38
High (>3,072)	2	5	4.07	0.43-38.1	13	7.9	0.71-87.75	37	30.0	3.76-239.38	5	45.38	3.4-595.41
<i>P</i> -trend			<0.05			<0.01			<0.01			<0.01	
<b>HPV-31</b>													
Negative	108	87	1.0		153	1.0		113	1.0		11	1.0	
Low (1-57)	10	14	1.97	0.73-5.3	20	1.87	0.75-4.69	18	2.07	0.79-5.44	1	1.56	0.19-13.07
High (>57)	7	4	0.58	0.2-1.78	27	1.56	0.62-3.93	21	1.57	0.62-4.01	3	3.20	0.86-11.68
<i>P</i> -trend			>0.05			>0.05			>0.05			>0.05	
<b>HPV-18</b>													
Negative	122	93	1.0		178	1.0		131	1.0		15	1.0	
Low (1-110)	2	6	1.97	0.45-8.65	15	2.31	0.57-9.41	8	2.7	0.79-9.15	0	ND	
High (>110)	1	6	4.67	0.59-37.0	7	2.93	0.35-24.72	13	8.0	1.32-48.24	0	ND	0.43-46.59
<i>P</i> -trend			>0.05			>0.05			<0.01			ND	
<b>HPV-33 group<sup>b</sup></b>													
Negative	106	70	1.0		136	1.0		112	1.0		12	1.0	
Low (1-92)	7	19	4.6	1.61-13.2	31	5.49	1.92-15.71	20	4.02	1.41-11.43	1	1.51	0.15-14.84
High (>92)	12	16	1.71	0.71-4.08	28	1.54	0.68-3.48	19	1.26	0.53-3.0	2	1.27	0.23-7.11
<i>P</i> -trend			<0.05			<0.05			>0.05			>0.05	
<b>Total viral load</b>													
Negative	88	48	1.0		88	1.0		36	1.0		4	1.0	
Low (1-1,307)	27	41	2.74	1.44-5.21	54	2.23	1.19-4.19	42	4.01	1.99-8.07	2	2.16	0.31-14.89
High (>1,307)	10	16	2.58	1.02-6.54	58	4.53	1.96-10.47	74	14.62	5.58-38.26	9	15.74	3.79-65.37
<i>P</i> -trend			<0.01			<0.01			<0.01			<0.01	

AOR, adjusted odds ratio (95% CI) estimated from polytomous logistic regression model; ND, not determined.

<sup>a</sup>Based on median of viral load for HPV-16, -31, -18, and 33 group positive participants.

<sup>b</sup>Include HPV-33, -52, -58, and -67.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Ammatuna P, Giovannelli L, Matranga D, Ciriminna S, Perino A. 2008. Prevalence of genital human papilloma virus infection and genotypes among young women in Sicily, South Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:2002–2006.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244–265.
- Broccolo F, Cocuzza CE. 2008. Automated extraction and quantitation of oncogenic HPV genotypes from cervical samples by real-time PCR-based system. *J Virol Methods* 148:48–57.
- Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantari M, Allan B, Williamson AL, Chung LP, Collins RJ, Zuna RE, Dunn ST, Chu TY, Cubie HA, Cuschieri K, von Knebel-Doeberitz M, Martins CR, Sanchez GI, Bosch FX, Munoz N, Bernard HU. 2005. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol* 79:30–40.
- Capra G, Giovannelli L, Bellavia C, Migliore MC, Calca MP, Perino A, Ammatuna P. 2008. HPV genotype prevalence in cytologically abnormal cervical samples from women living in south Italy. *Virus Res* 133:195–200.
- Castle PE, Schiffman M, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, Schussler JE, Wacholder S, Lorincz AT. 2005. Semiquantitative human papillomavirus type 16 viral load and the prospective risk of cervical precancer and cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1311–1314.

- Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. 2005. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 97:1066-1071.
- Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PT, Ferreccio C, Hieu NT, Matos E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjose S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJ, Franceschi S, and IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. 2005. HPV Prevalence Surveys Study Group. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: A pooled analysis. *Lancet* 366:991–998.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. 2003. Human Papillomavirus in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 88:63-73.
- Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Le Bail Carval K, Sautiere JL, Carbillet JP, Kantelip B, Schaal JP, Mouglin C. 2003. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of highgrade cervical lesions: A longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 106:396–403.
- De Francesco MA, Gargiulo F, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Manca N. 2005. Detection and genotyping of human papillomavirus in cervical samples from Italian patients. *J Med Virol* 75:588–592.
- Del Prete R, Di Taranto AM, Lipsi MR, Nirchio V, Antonetti R, Miragliotta G. 2008. Prevalence and genotypes identification of human papillomavirus infection in a population of South Italy. *J Clin Virol* 42:211–214.
- Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT, Giuliano AR. 2006. Crosssectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 118:1187–1193.

- Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Valloncini B, Manca N. 2007. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res* 125:176–182.
- Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple R, Higuchi R, Shah KV. 2003a. Reproducibility of HPV16 and HPV18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods* 112:23–33.
- Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti MC, Rodriguez AC, Helzlsouer KJ, Schiffman M. 2003b. A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:477–484.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338:423–428.
- Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qvarforth-Tubbin P, Andersen PK, Melbye M, Adami HO, Gyllenstein UB. 2000. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: A nested case–control study. *Lancet* 355:2189–2193.
- Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT. 2005. The elevated 10-year risk of Cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus type 16 or 18. *J Natl Cancer Inst* 97:1072–1079.
- Kjaer SK, Van Den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, Suntum M, Bock JE, Poll PA, Meijer CJ. 2002. 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. *Br Med J* 325:572.

- Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S, Rush BB, Gravitt PE, Schussler JE, Schiffman M. 2002. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 360:228–229.
- Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. 2003. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol* 41:3221–3228.
- Moberg M, Gustavsson I, Gyllenstein U. 2004. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer* 112:854–859.
- Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. 2005. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer* 92:891–894.
- Munoz N, Bosch FX, DeSanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518–527.
- Pretet JL, Dalstein V, Monnier-Benoit S, Delpout S, Mouglin C. 2004. High risk HPV load estimated by Hybrid Capture II correlates with HPV 16 load measured by real-time PCR in cervical smear. *J Clin Virol* 31(2):140-147.
- Rassa M, Bertoloni G, Mengoli C, Peron A, Benedetti P, Palu' G. 2005. HPV genotype prevalence in cervical specimens with abnormal cytology: A report from North-east Italy. *Scand J Infect Dis* 37:476–481.
- Roden R, Wu TC. 2006. How will HPV vaccines affect cervical cancer. *Nat Rev Cancer* 6:753–763.
-

- Ronco G, Ghisetti V, Segnan N, Snijders PJ, Gillio-Tos A, Meijer CJ, Merletti F, Franceschi S. 2005. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy. *Eur J Cancer* 41:297–305.
- Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL. 2003. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 95:1336–1343.
- Sherman ME, Wang SS, Wheeler CM, Rich L, Gravitt PE, Tarone R, Schiffman M. 2003. Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: Dominant impact of surrounding low-grade lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:1038–1044.
- Schiffman M, castle PE, jeronimo J. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370:890-907.
- Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY. 2002. Viral load of high risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 76:41–47.
- Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Follen Mitchell M, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, Icenogle JP. 1999. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol* 37:1030–1034.
- Tornesello ML, Duraturo ML, Botti G, Greggi S, Piccoli R, De Palo G, Montella M, Buonaguro L, Buonaguro FM, Italian HPV Working Group. 2006. Prevalence of alpha-papillomavirus genotypes in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma in the Italian population. *J Med Virol* 78:1663–1672.
-

- Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. 2006. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1274–1280.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12–19.
- Wallin KL, Wiklund F, Ingström T, Bergman F, Stendal U, Wadell G, Hallmans G, Dillner J. 1999. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* 341:1633–1638.
- Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. 2007. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7:11–22.
- Ylitalo N, Josefsson A, Melbye M, Sorensen P, Frisch M, Andersen PK, Sparén P, Gustafsson M, Magnusson P, Ponten J, Gyllensten U, Adami HO. 2000. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res* 60:6027–6032.
- Zerbini M, Venturoli S, Cricca M, Gallinella G, De Simone P, Costa S, Santini D, Musiani M. 2001. Distribution and viral load of type specific HPVs in different cervical lesions as detected by PCRELISA. *J Clin Pathol* 54:377–380.
- Zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342–350. Review.
-

- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. 2003. Human Papillomavirus in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 88:63-73.