

UNIVERSITA' DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia

Direttore Chiar.mo Prof. Mario Campa

Tesi di Specializzazione

**Prevalenza e distribuzione delle infezioni
da HPV nella popolazione**

della provincia di Massa e Carrara negli anni 2009 e 2010

Relatore

Candidata

Chiar.mo Prof. Mauro Pistello

Dott.ssa Luciana Cinquanta

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

CAPITOLO 1: RIASSUNTO	4
CAPITOLO 2: INTRODUZIONE	7
2.1 Caratteri generali del papillomavirus	8
2.2 Ciclo replicativo	11
2.2.1 Mantenimento del genoma	11
2.2.2 Infezione produttiva	12
2.2.3 Amplificazione genica	12
2.2.4 Assemblaggio particelle virali	13
2.3 Meccanismi patogenetici	14
2.4 Classificazione dei papillomavirus	17
2.5 Vie di trasmissione	21
2.6 Storia naturale dell'infezione	21
2.7 Cofattori e fattori dell'ospite	22
2.8 Fattori virali	24
2.9 Aspetti clinici delle infezioni da HPV	24
2.10 Epidemiologia	28
2.10.1 Prevalenza	28
2.10.2 Incidenza	29
2.11 Diagnosi e monitoraggio dell'infezione	30
2.11.1 Esame Citologico	30

2.11.2 Metodi molecolari	33
2.11.2a Ibridizzazione diretta	33
2.11.2b Ibridizzazione in soluzione	34
2.11.2c Test di amplificazione genica	37
2.11.2d Metodo del pirosequenziamento	39
CAPITOLO 3: OBIETTIVO DELLO STUDIO	42
CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI	44
4.1 Pazienti	45
4.2 Estrazione degli acidi nucleici	45
4.3 Amplificazione genica	46
4.4 Immobilizzazione dei prodotti di PCR	49
4.5 Preparazione della piastra di sequenziamento	50
4.6 Denaturazione dei prodotti di amplificazione immobilizzati	51
4.7 Annealing dei primer di sequenziamento	51
4.8 Pirosequenziamento	52
4.9 Analisi Statistica	53
CAPITOLO 5: RISULTATI	54
CAPITOLO 6: DISCUSSIONE	67
CAPITOLO 7: BIBLIOGRAFIA	71
CAPITOLO 8: RINGRAZIAMENTI	78

CAPITOLO 1

RIASSUNTO

RIASSUNTO

I papillomavirus umani (HPV) sono un gruppo di virus appartenenti alla famiglia delle *Papillomaviridae*, hanno DNA circolare a doppia elica contenuto in un capsidico icosaedrico di 55nm di diametro e sono sprovvisti di envelope. Di HPV ne esistono oltre 200 tipi, di cui 100 ben caratterizzati: 80 infettano l'uomo a livello cutaneo-mucoso, 40 invece sono stati riscontrati a livello delle mucose genitali, orali e respiratorie e 15 sono oncogenetici. La maggior parte degli HPV causa malattie non gravi, come ad esempio le verruche cutanee. Altri possono causare verruche genitali e tumori benigni quali il condiloma (genotipi a basso rischio), o tumori maligni quali il cancro del collo dell'utero e del pene (genotipi ad alto rischio).

L'infezione da HPV è la più comune tra le malattie a trasmissione sessuale e può avvenire anche per semplice contatto delle mucose genitali. L'identificazione dell'HPV come agente causale per lo sviluppo del carcinoma della cervice uterina e la rilevazione dei diversi genotipi con diverso potenziale oncogeno, ha permesso di individuare con maggiore accuratezza le donne che rischiano di sviluppare una lesione di alto grado o un carcinoma invasivo.

Da queste premesse abbiamo avviato uno studio per la ricerca e la genotipizzazione di HPV su campioni raccolti nel 2009 e 2010 da popolazione prevalentemente di sesso femminile e proveniente da ambulatori e da programma di screening. Grazie ai risultati ottenuti si è potuto constatare che il rischio di contrarre un'infezione aumenta con il numero dei partner sessuali ed è massimo nelle giovani sessualmente attive (inferiore ai 25 anni e tra i 26/35), per poi decrescere con il passare degli anni. I genotipi riscontrati più frequentemente sono il 16, il 18 ed il 31, tutti genotipi ad alto rischio. Va però sottolineato, come si evince dalla letteratura, che la massima parte delle infezioni è transitoria nell'80% dei casi e si ha quindi l'eliminazione spontanea del virus.

In riferimento al 2009 e al 2010, nei campioni di provenienza

ambulatoriale, abbiamo riscontrato che i genotipi 16 e 18 tendono a diminuire da un anno all'altro. Tutto ciò potrebbe essere spiegato in relazione alla recente introduzione del vaccino in giovani adolescenti. Dati recenti in letteratura suggeriscono che l'immunizzazione vaccinale stia causando una progressiva riduzione della diffusione dei genotipi 16 e 18. Da qui l'importanza della biologia molecolare e del metodo del pirosequenziamento che ci consente lo studio dei genotipi più rilevanti dal punto di vista clinico a partire da un singolo prodotto di amplificazione e con sensibilità notevolmente superiori ai tradizionali metodi citologici.

CAPITOLO 2

INTRODUZIONE

2.1 CARATTERI GENERALI DEL PAPILOMAVIRUS

I papillomavirus (PV) (fig.1) appartengono alla famiglia delle *Papillomaviridae* [De Villiers EM, 2004]. Sono piccoli virus nudi a simmetria icosaedrica con DNA circolare a doppia elica di circa 8 kilobasi, contengono un capside icosaedrico di 55nm di diametro sprovvisto di involucro, e possiedono uno specifico tropismo per gli epitelio cutaneo e mucoso.

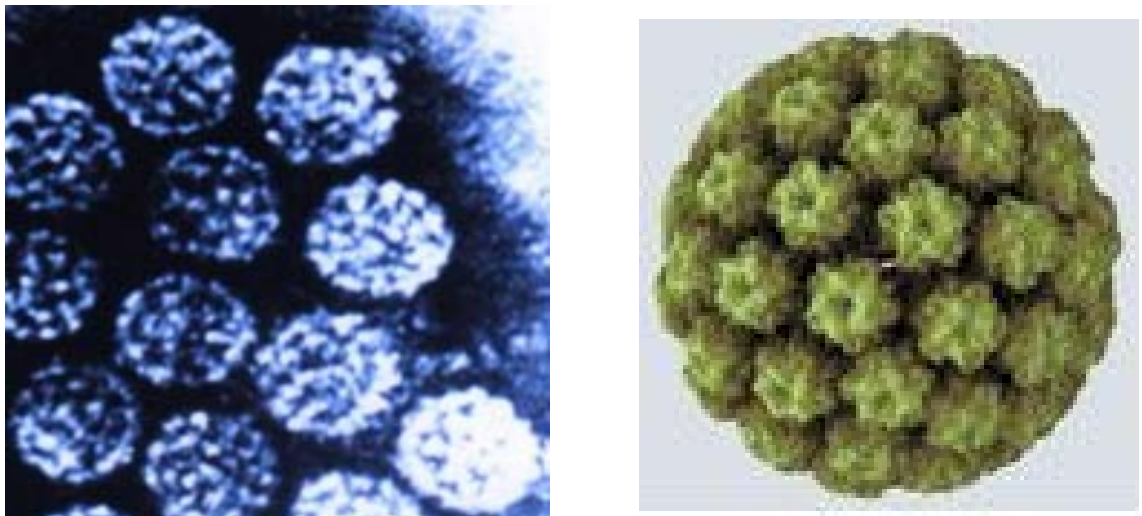


Figura 1: immagine tridimensionale e in microscopia elettronica di HPV.

La loro replicazione è ristretta a questo tipo di cellule ed è condizionata dallo stadio di differenziamento cellulare. I PV sono stati rinvenuti in tantissime specie animali; e sono specie-specifici. Fino ad ora sono stati identificati circa 200 differenti tipi di papillomavirus umani ; il genoma di 100 tipi di questi virus è stato completamente sequenziato e caratterizzato, circa

35-40 infettano l'area ano-genitale, alcuni di questi si associano quasi esclusivamente a lesioni benigne e vengono perciò detti "tipi a basso rischio oncogeno", mentre altri si associano soprattutto a lesioni di alto grado e carcinoma invasivo e perciò sono detti "tipi ad alto rischio oncogeno". Il genoma è essenzialmente diviso in 3 regioni (fig. 2, fig.3):

- ? PRIMA REGIONE: regione non codificante chiamata Long Control Region (LCR), le cui dimensioni sono notevolmente diverse tra i genomi dei diversi tipi di HPV. All'interno di questa regione sono concentrate le sequenze regolatorie richieste per la replicazione e trascrizione virale.

- ? SECONDA REGIONE: regione Early (E) chiamata anche regione precoce (codificante per proteine virali precoci). Rappresenta il 45% del DNA virale e contiene 8 geni che codificano proteine non strutturali denominate da E1 a E8. E' implicata nella replicazione virale e nell'oncogenesi (produce proteine ad azione trasformante) in grado di indurre proliferazione e immortalizzazione delle cellule umane.

- ? TERZA REGIONE: regione Late (L) chiamata anche regione tardiva (codificante per proteine virali tardive). Corrisponde al 40% del DNA, ed è una regione molto conservata comprensiva di 2 geni che codificano per la sintesi delle proteine strutturali capsidiche, denominate L1 ed L2 [Doorbar J, Ely S, 1991].

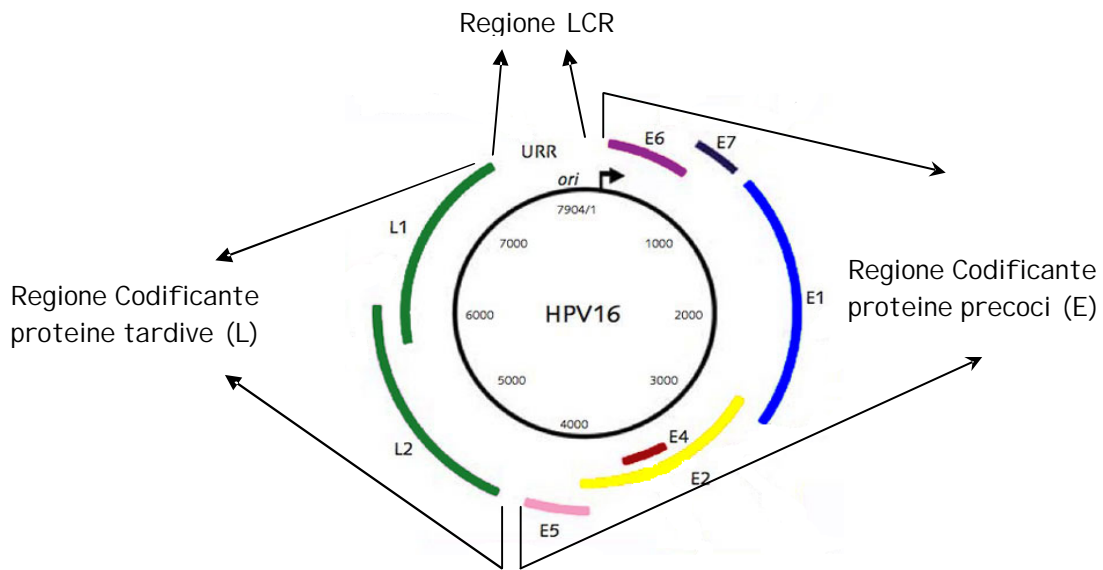


Figura 2: rappresentazione schematica del genoma di HPV 16.

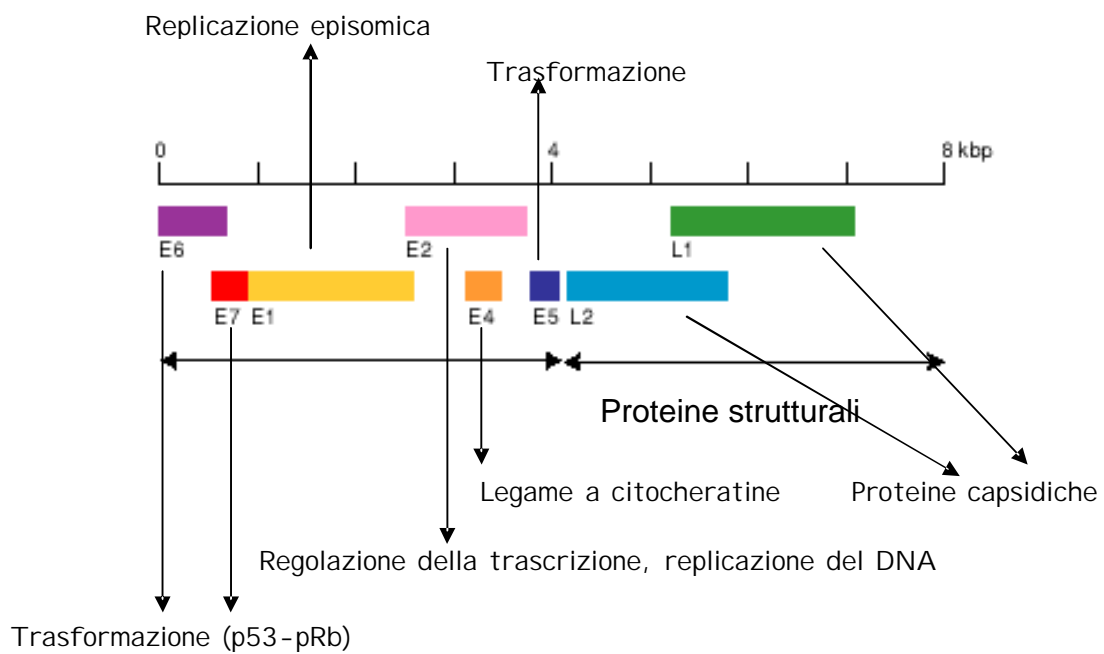


Figura 3: mappa del genoma virale.

2.2 CICLO REPLICATIVO

L'infezione inizia con l'accesso delle particelle virali all'interno delle cellule dello strato basale; per alcuni tipi di papillomavirus umani (HPV) si pensa sia necessaria una soluzione di continuità dell'epitelio stratificato. Tale lesione può non essere visibile macroscopicamente e può crearsi quando la cute è esposta all'acqua, quando è abrasa o quando è sottoposta ad altre condizioni ambientali che favoriscono lo sviluppo di microtraumi [Zur Hausen H, 2000]. Esistono forti controversie sulla natura dei recettori cellulari di superficie che permettono l'iniziale adesione del virus alla cellula ospite. Recenti lavori hanno suggerito che l'internalizzazione delle particelle virali sia un processo lento e che possa avvenire attraverso l'endocitosi di vescicole rivestite di clatrina [Culp TD, 2006]; altri autori sostengono che responsabile dell'ingresso del virus nella cellula infettata sia l'integrina $\alpha 4 \beta 6$ [Howley P.M., 2001]. La scapsidazione è facilitata dalla rottura dei legami disolfuro intracapsidici, permettendo al DNA virale di essere trasportato nel nucleo grazie a segnali di localizzazione nucleare, sebbene i processi di scapsidazione e di importazione nucleare del genoma virale rimangono tuttora ampiamente sconosciuti.

2.2.1 MANTENIMENTO DEL GENOMA

L' HPV mantiene il suo genoma in forma episomale nelle cellule basali dell'epitelio (fig.4) che costituiscono l'unico strato in attiva divisione e replicazione. L'infezione da HPV di queste cellule porta all'attivazione a cascata dell'espressione dei geni virali che determinano una produzione di copie extracromosomiche di DNA virale (da 20 a 100 copie per cellula) [Sterling j, 1990]. Questa replicazione dell'acido nucleico del virus avviene in

media una volta, per divisione cellulare durante la fase “S” in sincronia con i cromosomi della cellula ospite ed è trasmesso alle cellule figlie. Ricerche mirate affermano che proteine virali E1-E2 sono espresse allo scopo di mantenere il DNA dell’ HPV in forma episomale. L’espressione di E1 e probabilmente di E2, sembra essere sufficiente al mantenimento basale degli episomi virali [Doorbar j, 2006]. Questo tipo di replicazione assicura un’infezione latente e persistente nelle cellule basali dell’epidermide.

2.2.2 INFEZIONE PRODUTTIVA

Nell’epitelio normale le cellule basali escono dal ciclo cellulare subito dopo aver migrato nello strato sopra basale, andando incontro al processo di differenziazione terminale; durante questo processo si verificano dei cambiamenti di struttura dei filamenti intermedi di cheratina e la secrezione di lipidi, fattori che permettono all’epitelio di superficie di creare una barriera fisica nei confronti dell’ambiente circostante [Frazer IH, 2004]. Durante l’infezione da HPV la proteina E7 (e forse anche la E6) viene espressa in queste cellule, è abolito il blocco alla progressione del ciclo cellulare ed il processo di normale differenziazione terminale viene ritardato.

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

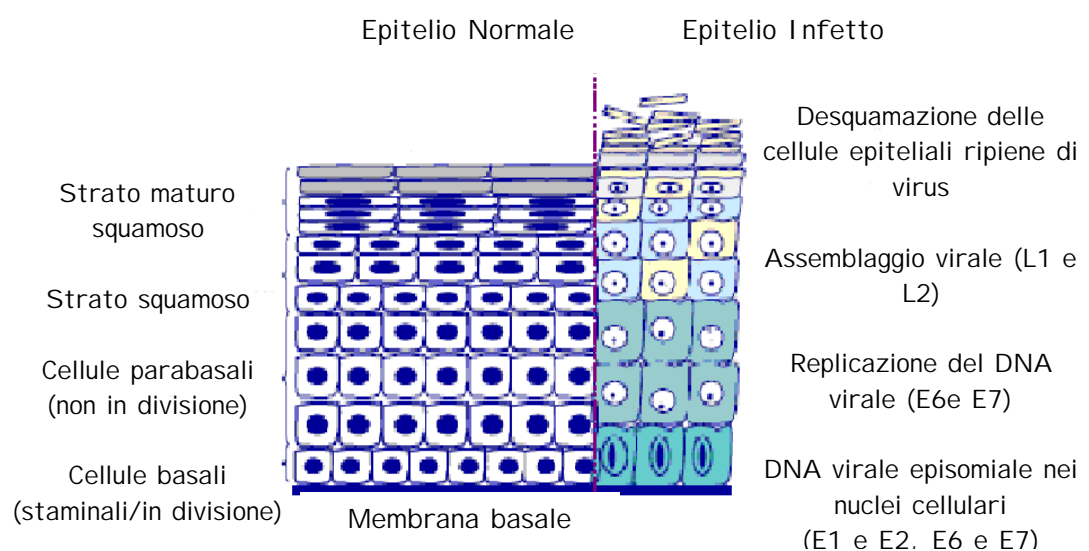
2.2.3 AMPLIFICAZIONE GENICA

Per la produzione di virioni, l’HPV deve amplificare il suo genoma ed inserirlo all’interno delle particelle infettanti. L’amplificazione del genoma

virale inizia in un piccolo gruppo di cellule del compartimento proliferativo e richiede l'espressione di tutti i geni precoci. La formazione del complesso E1-E2 può permettere il procedere della replicazione stessa anche in assenza di sintesi cellulare di DNA. Il genoma appena replicato servirà come modello per l'ulteriore espressione di E1 ed E2, espressione che faciliterà un'addizionale amplificazione del genoma virale [Middleton K, 2003].

2.2.4 ASSEMBLAGGIO PARTICELLE VIRALI

L'HPV codifica per due proteine strutturali espresse negli strati più superficiali del tessuto infettato quando è stata completata l'amplificazione del genoma virale. Le particelle di HPV sono così costituite da un genoma di circa 8.000 bp, posto all'interno di un capsid che contiene copie della proteina maggiore L1 e da copie della proteina minore L2. Infine, il virus deve uscire dalle cellule infettate e sopravvivere nell'ambiente extra cellulare per un periodo di tempo variabile prima di provocare una nuova infezione.



da: Frazerbl H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. Nat Rev Immunol.

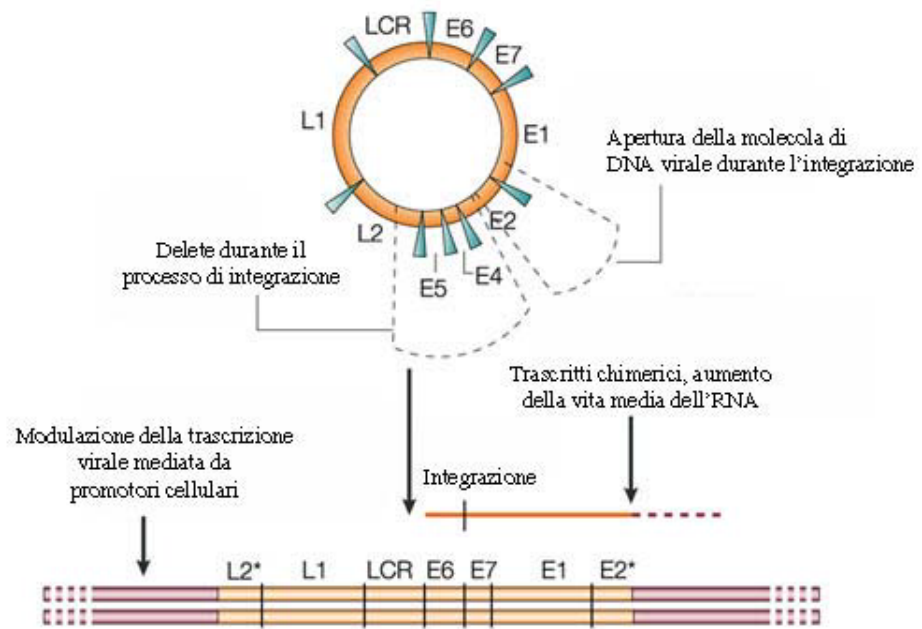
Figura 4: ciclo replicativo di HPV.

2.3 MECCANISMI PATOGENETICI

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

Invece, nelle lesioni ad alto grado indotte dalla infezione da HPV ad alto rischio, quali HPV-16 e HPV-18, avviene l'integrazione del DNA virale nel DNA cellulare (Fig.5), con conseguente mancata produzione di una progenie virale completa. Il DNA si linearizza e interrompendosi in un punto preciso, si integra stabilmente nel genoma della cellula ospite, diventando un gene soprannumerario.

Tale integrazione è determinante nei meccanismi di trasformazione ed immortalizzazione cellulare, poiché si verifica a livello della ORF E2, con conseguente perdita dell'azione repressiva di E2 sulle oncoproteine virali E6 e E7, che svolgono un ruolo fondamentale nei meccanismi di tumorigenesi [Longworth MS, 2004]. Pertanto nelle cellule dei tumori indotti da HPV ad alto rischio, i geni E1, E6 e E7 sono integrati e funzionali, con conseguente stimolo alla proliferazione cellulare, mentre i geni E2, E4 e E5 vengono persi o non sono trascritti. L'attività oncogena delle due proteine si basa sulla loro capacità, da un lato, di inattivare proteine cellulari quali retinoblastoma (pRB) (fig. 6) e p53 (Fig. 7) deputate al controllo della proliferazione cellulare e, dall'altro, di stimolare l'attività di fattori trascrizionali (E2F) ed enzimi (telomerasi) che regolano in senso positivo la proliferazione. Questi eventi determinano un'aumentata proliferazione dell'epitelio cervicale con comparsa di alterazioni citologiche caratteristiche.



(modificata da zur Hausen, 2002. Nat. Rev. Cancer. 2:342-350).

Figura 5: meccanismo di integrazione del DNA virale in quello cellulare.

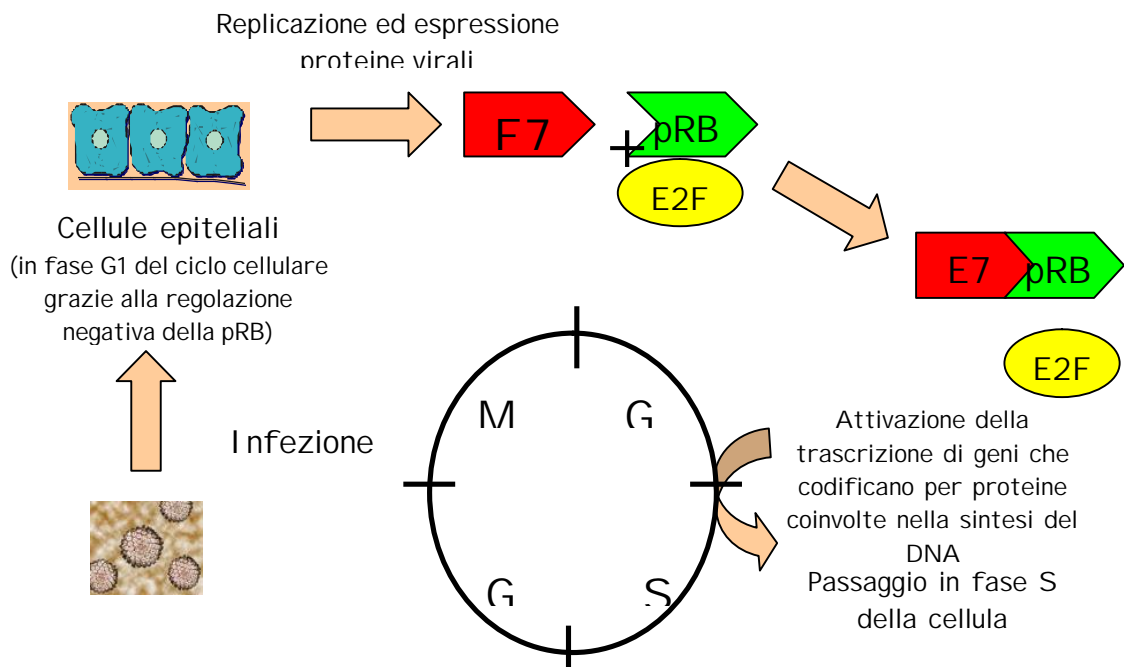


Figura 6: interazione della proteina E7 di HPV e pRB umana.

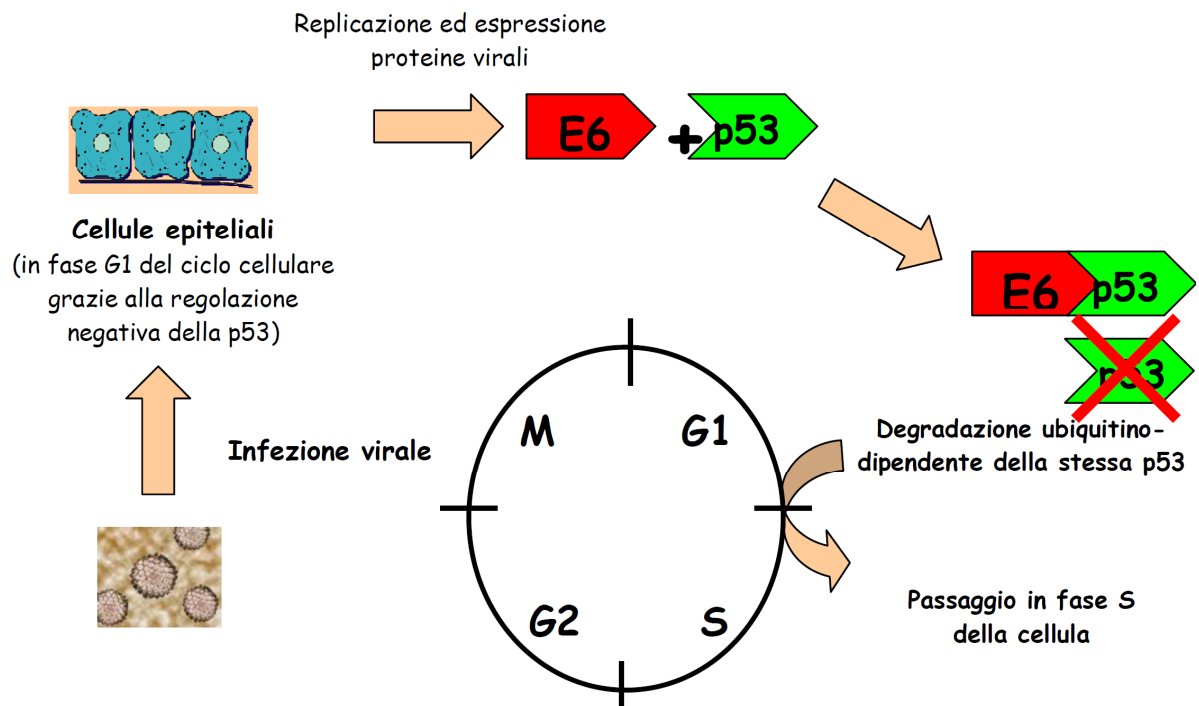


Figura 7: interazione della proteina E6 di HPV e p53 umana.

2.4 CLASSIFICAZIONE DEI PAPILOMAVIRUS

La famiglia *Papillomaviridae* è divisa in 12 generi, di cui 5 appartengono ai papillomavirus umani (Alpha, Beta, Gamma, Mu e Nu) (Fig.8); nel genere alpha si raggruppano principalmente quelli che hanno un tropismo specifico per l'epitelio mucoso; Beta, Gamma, Mu e Nu hanno un tropismo per gli epitelii cutanei.

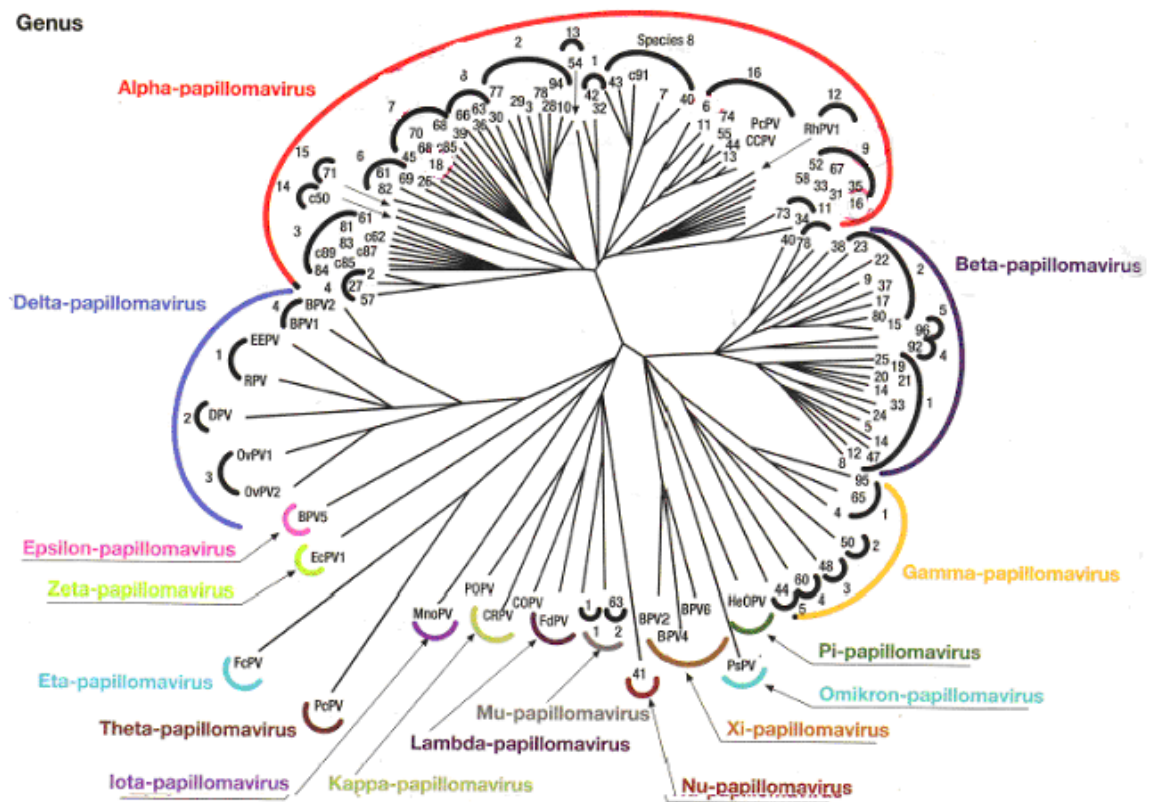


Figura 8: albero filogenetico dei papillomavirus.

CLASSIFICAZIONE EPIDEMIOLOGICA: gli HPV sono suddivisi in virus ad alto rischio oncogeno e a basso rischio oncogeno sulla base delle lesioni a cui sono associati [Munoz N, Bosh FX, 2003] (Tab.1)

HPV alto rischio	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66...
HPV basso rischio	6, 11, 26, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 62, 66...

Tabella 1: suddivisione di HPV in base al potenziale oncogeno.

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

Analizzando i risultati di studi condotti in varie parti del mondo, lo IARC (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro) ha più recentemente identificato ufficialmente i tipi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66 come agenti cancerogeni, mentre i tipi HPV 6 e HPV 11 sono considerati possibilmente cancerogeni per la specie umana [IARC Working Group, 2007].

CLASSIFICAZIONE IN BASE AL TROPISMO DEL VIRUS: sono suddivisi in due grandi categorie, HPV cutanei ed HPV mucosali.

- ? HPV cutanei causano lesioni cutanee come le verruche comuni o volgari (sono le forme più diffuse), si localizzano frequentemente a livello delle mani e dei piedi; un'altra parte dei tipi HPV cutanei si associano con la epidermodisplasia verruciforme (Tab.2).

Tabella 2: Associazione tra lesioni cutanee e genotipi di HPV

Lesioni cutanee	Genotipi
Verruche comuni, piane, plantari e palmari	1, 2, 3, 4, 7, 10, 26-29, 41, 48, 49, 75, 76, 77
Verruche in epidermide verruciforme	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 46, 47
Carcinomi cutanei in epidermide verruciforme	5, 8, 14, 17, 20, 47
Carcinomi cutanei	16, 18, 33, 34, 35, 41

- ? HPV mucosali causano diversi tipi di lesioni a carico del tratto genitale sia nelle donne che negli uomini; HPV 6 e HPV 11, appartenenti ai tipi a basso rischio, portano alla formazione di condilomi acuminati (verruche benigne), mentre i tipi ad alto rischio sono riscontrati in lesioni squamose intraepiteliali che possono progredire verso il carcinoma squamoso invasivo (Tab.3).

Tabella 3: Associazione tra lesioni mucose e genotipi di HPV

Lesioni mucose	Genotipi
VIE RESPIRATORIE: Papillomi Ca. Laringo-bronchiali	6, 11 16, 18
CONGIUNTIVA: Papillomi	6,11
CAVITA' ORALE: Iperplasia epiteliale e focale Ca. Oro-faringei	13, 32 16,18
TRATTO GENITALE: Condilomi acuminati Condilomi piani Papulosi bowenoide Ca. Vulvari, penieni, anali Ca. Cervice uterina	6,11 6, 11, 16, 18, 31 16 16, 18, 31, 33, 39, 40, 59, 68 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 68, 71, 74

Altre zone del distretto ano-genitale frequentemente associate ad infezione da HPV sono il pene, la vagina, l'ano e la vulva. Recentemente è stata evidenziata la presenza di HPV ad alto rischio anche in carcinomi del distretto testa-collo, il particolare cavo orale ed orofaringe [Termine N, 2008].

2.5 VIE DI TRASMISSIONE

? ORIZZONTALE:

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

Non sessuale= contatto diretto e fomite come abiti contaminati o strumenti medici.

? VERTICALE:

l'infezione si può trasmettere al neonato al momento del parto. Se il neonato viene infettato dai tipi di HPV 6 e 11, può sviluppare la papillomatosi respiratoria ricorrente o papillomatosi laringea giovanile.

2.6 STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE

La storia naturale dell'infezione genitale da HPV è fortemente condizionata dall'equilibrio che si instaura fra ospite ed agente infettante. Nella maggior parte dei casi, infatti, il virus viene eliminato dalla risposta immunitaria dell'ospite prima di sviluppare un effetto patogeno; in altri casi può restare latente o andare incontro a replicazione provocando una lesione a livello genitale che, se non regredisce spontaneamente, può manifestarsi attraverso diverse forme cliniche. Circa l'80% delle infezioni sono transitorie asintomatiche e guariscono spontaneamente grazie alla risposta immunitaria cellulo-mediata; il periodo medio di regressione di un'infezione da HPV è 6-18 mesi, come risulta in diversi studi [Bulkmans NW, 2007]. La persistenza

dell'infezione è invece la condizione necessaria per l'evoluzione verso il carcinoma; i genotipi di HPV ad alto rischio hanno una maggiore probabilità di infezione persistente. L'età è un altro fattore importante: la probabilità di infezione persistente aumenta dopo i 35 anni. Il periodo che intercorre fra l'infezione e l'apparizione dei primi segni clinici varia da 1-10 anni. Solo una piccola percentuale (<5%) delle donne che hanno acquisito un'infezione sviluppano il tumore [Walboomers JM, 1999], [Schiffman M, 2007].

2.7 COFATTORI E FATTORI DELL'OSPITE

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

1. l'attività sessuale. Diversi studi hanno stabilito che l'età precoce al primo rapporto sessuale, il numero elevato di partner sessuali e un'elevata promiscuità sessuale del partner incrementa fino a dieci volte il rischio [Munoz N, Castellsagué X, 2006], [Parkin DM, Bray F, 2006].
2. l'utilizzo a lungo termine (più di 5 anni) di contraccettivi orali, (progesterone ed estrogeno) è associato con lo sviluppo di lesioni preneoplastiche e cancro della cervice [Munoz N, Castellsagué X, 2006], [Parkin DM, Bray F, 2006], [Castellsagué X, Diaz M, 2006], [Castellsagué X, De Sanjose S, 2007].
3. fumo di sigaretta. Diversi studi dimostrano l'influenza sull'incidenza e persistenza delle infezioni da HPV in donne fumatrici.
4. gravidanze multiple (5, 7 o più bambini) sono un fattore di rischio tra

donne che presentano infezione da HPV [Castellsagué X, Munoz N, 2003], [Clifford G, 2006].

5. co-infezione con altri virus a trasmissione sessuale come CMV, HHV-6, HHV-7 e HSV-2 può indirettamente modificare le barriere dell'epitelio ed intervenire nel processo di infiammazione cervicale.
6. immunodepressione. Numerosi studi hanno evidenziato una maggiore prevalenza di infezione da HPV e di lesioni della cervice nelle donne sieropositive rispetto alle donne sieronegative. Tali lesioni presentano nelle pazienti HIV-positive una maggiore tendenza alla persistenza e alla progressione a carcinoma invasivo [Palefsky J, 2007], [Bosch FX, 2008]. L'infezione da HIV interviene nella patogenesi dei papillomavirus soprattutto mediante l'effetto immunodepressivo che riduce la risposta immune cellulo-mediata e favorisce la persistenza dell'infezione da HPV, ma sono stati evidenziati anche meccanismi di interazione diretta, quali la produzione da parte delle cellule infette di citochine come l'IL6 che andrebbe a modulare l'espressione dei geni dell'HPV nei cheratinociti infetti. Anche soggetti con un difetto nell'immunità cellulo-mediata (da linfociti T) e soggetti trapiantati sottoposti a terapia immunosoppressiva dimostrano di essere molto suscettibili all'infezione da HPV e alle loro complicanze [Del Mistro A, 2001], [Ferlay J, 2004].
7. abitudini alimentari. Acido folico, vitamine B, C, E e B12 α -carotene hanno un ruolo protettivo [Solomon D, 2001], [Castle PE, Giuliano AR, 2003].

2.8 FATTORI VIRALI

1. Genotipo di HPV. La maggioranza delle infezioni da HPV a basso rischio tendono a regredire spontaneamente senza causare lesioni, invece la presenza di tipi ad alto rischio, come HPV 16 e HPV 18, è spesso associata a lesioni precancerose e ai carcinomi invasivi.
2. Carica virale. Diversi studi hanno mostrato che pazienti con alta carica virale di HPV ad alto rischio possono avere un rischio aumentato di sviluppare il cancro della cervice. È importante anche l'integrazione del virus nel DNA dell'ospite [Hubbard RA, 2003], [Lillo F, 2008].

2.9 ASPETTI CLINICI DELLE INFEZIONI DA HPV

MANIFESTAZIONI CLINICHE: Si distinguono lesioni cutanee, mucose benigne e mucose maligne.

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

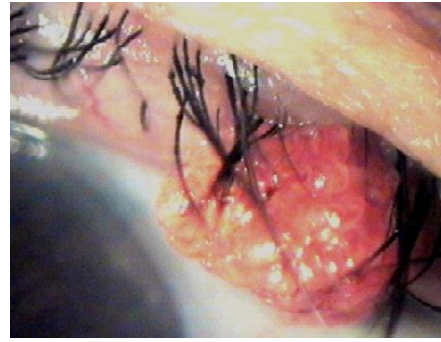
- LESIONI MUCOSE BENIGNE: comprendono prevalentemente condilomi acuminati e piani, che sono conseguenti a trasmissione sessuale del virus e insorgono a livello dei genitali maschili e femminili, dell'uretra, dell'area perianale e dell'ano (fig.10 a,b,c,d). Si manifestano come masse esofitiche verrucose di consistenza molle (condilomi piani) o modestamente rilevate (condilomi acuminati). Sono generalmente associati ad infezioni dei genotipi 6 e 11 di HPV (a basso rischio) e non portano quasi mai a cancro. La maggior parte delle lesioni è asintomatica e si può risolvere spontaneamente in 3-4 mesi, rimanere invariata o aumentare di dimensione e numero. La papulosi Bowenoide, causata da HPV-16 e HPV-18, comprende verruche di colore rosso-marrone e devono essere sottoposte a biopsia; dal punto di vista istologico possono presentare la stessa configurazione delle neoplasie intraepiteliali. Altre sedi mucose infettate dagli HPV, caratterizzate da lesioni benigne di tipo papillomatoso, si trovano a livello respiratorio, congiuntivale e orale.



Figura 9: lesioni cutanee.



a



b



c



d

Figura 10: a. Papilloma laringeo, b. Papilloma congiuntivale, c. Microcondilomi sul collo dell'utero, d. Condilomi acuminati anali

– LESIONI MUCOSE MALIGNI: sono caratterizzate da lesioni squamose intraepiteliali (SIL) che si manifestano con grandi cellule arrotondate con atipie nucleari e alone perinucleare dette coilociti. Le SIL sono suddivise in SIL a basso grado (LGSIL) e SIL ad alto grado (HGSIL). A livello di vagina, vulva, ano e pene si riscontrano lesioni simili: neoplasie intraepiteliali vaginali (VAIN), vulvari (VIN), anali (AIN) e peniene (PIN). Secondo la classificazione istologica si distinguono tre gradi di neoplasia intraepiteliale cervicale (CIN):

- CIN1 (lieve, corrisponde ad LGSIL)
- CIN2 (moderata, corrisponde ad HGSIL)
- CIN3 (grave, corrisponde ad HGSIL) (Fig. 11).

Nelle LGSIL si riscontrano sia tipi di HPV a basso che ad alto rischio oncogeno. La maggior parte delle lesioni di basso grado mantiene il virus in forma episomale e sostiene un ciclo di replicazione completo: sono espressi anche geni tardivi e originano particelle virali complete. Le HGSIL sono prevalentemente associate ad HPV ad alto rischio, che non possono però compiere un ciclo di replicazione completo, a causa di difetti differenziativi tipici di queste lesioni.



Figura 11: collo dell'utero con lesione CIN 3

2.10 EPIDEMIOLOGIA

Le infezioni da HPV rappresentano una tra le cause più comuni delle malattie sessualmente trasmesse diffuse in tutto il mondo; si stima che circa l'80% delle persone contrae il virus almeno una volta nella vita: l'infezione interessa sia donne che maschi, soprattutto nella fascia giovanile, all'inizio dell'attività sessuale. Nella maggioranza dei casi l'infezione è di tipo transiente e il virus viene eliminato dal sistema immunitario senza provocare lesioni. L'infezione persistente da HPV, invece, è ormai stata definitivamente stabilita essere un fattore necessario, anche se non sufficiente, per lo sviluppo del carcinoma della cervice (Fig. 12)

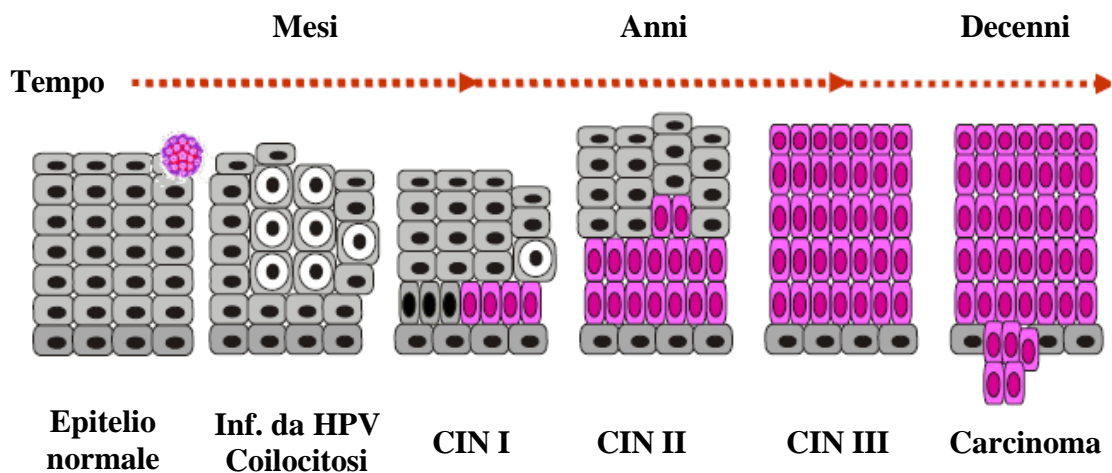


Figura 12: persistenza dell'infezione da HPV e progressione della malattia.

2.10.1 PREVALENZA

La prevalenza dell'infezione da HPV a livello della cervice uterina in donne sessualmente attive varia in relazione all'area geografica ed all'età: mostra un picco a 20-25 anni e decresce con l'età; si osserva una riattivazione dopo la menopausa per fattori ancora non chiari come: comportamento

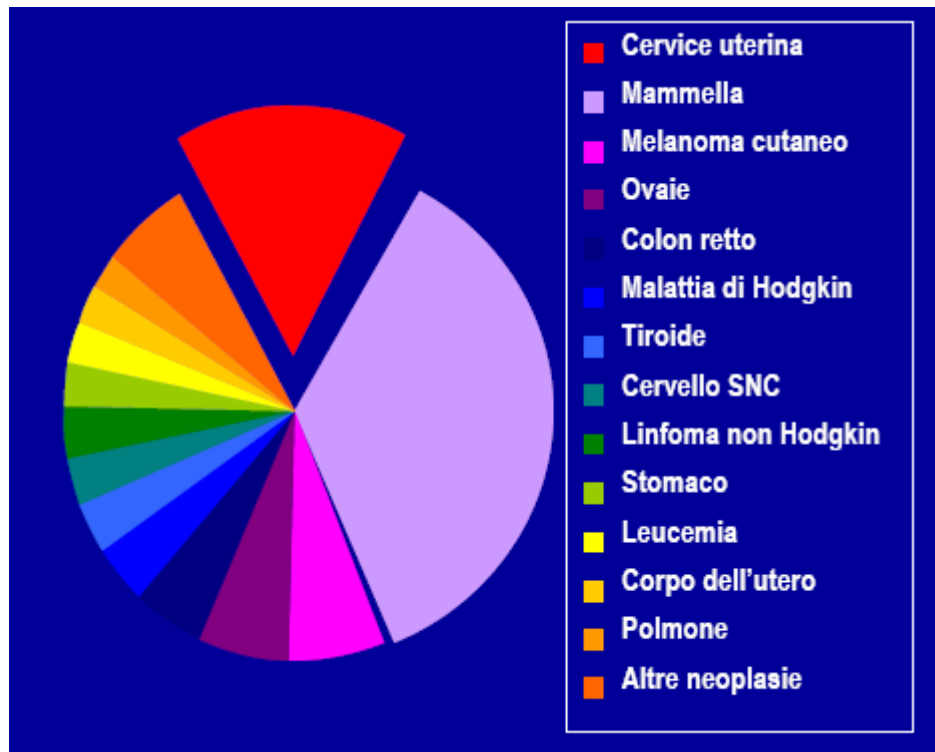
sessuale (nuovo partner), cambiamento ormonale, riattivazione di infezione latente. La prevalenza dell'infezione da HPV a livello della cervice uterina nelle donne con citologia normale è intorno al 10%, in donne con lesioni di basso grado è del 71,6%, la prevalenza aumenta nelle donne con lesioni di alto grado (84%) e con carcinoma della cervice (99,7%).

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

2.10.2 INCIDENZA

Il carcinoma della cervice costituisce la seconda causa di cancro nella donna, dopo il carcinoma della mammella (Fig.13), con 273,505 vittime ogni anno nel mondo. Ogni anno sono riportati 493.243 nuovi casi, di cui l'83,1% in paesi in via di sviluppo: 68.000 in Africa, 77.000 in America Latina e 245.000 in Asia.

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



Da: Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0 IARC Cancer-Base No.5. Lyon. IARC Press, 2001.

Figura 13: incidenza del cancro per organo, in Europa, nelle donne con età compresa fra 15-44 anni

2.11 DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELL'INFEZIONE

2.11.1 ESAME CITOLOGICO

L'introduzione, negli anni '60, di programmi di screening citologico (PAP test) nella popolazione femminile sessualmente attiva ha permesso di ridurre del 50-70% l'incidenza del carcinoma della cervice uterina e la mortalità ad esso associata. Tuttavia, il beneficio di questi programmi dipende in gran parte dalla capillarità con cui vengono effettuati e dalla qualità ed

efficacia della lettura dei preparati. Nella migliore delle ipotesi, la sensibilità del PAP test nel diagnosticare una lesione cervicale non eccede l'80%, conseguentemente, un certo numero di donne va incontro a carcinoma invasivo nonostante la partecipazione a programmi di prevenzione: il cancro della cervice rimane infatti la seconda causa di morte per neoplasia della popolazione femminile.

Il tradizionale Pap-test eseguito su vetrino strisciato è stato ormai sostituito con un nuovo tipo di Pap test denominato su strato sottile "ThinPrep" (Fig.14), in cui le cellule non vengono più strisciate sul vetrino, ma sospese in una soluzione, a base di alcool che le conserva intatte per alcune settimane, si risolve così finalmente il problema degli artefatti della fase dello striscio e di fissazione, che ha generato non pochi errori nei Pap Test del passato.



Figura 14: ThinPrep-Pap Test.

Dopo il prelievo con apposito tampone e flacone di raccolta, il ThinPrep

prevede inizialmente tre fasi strumentali:

1. dispersione: separa muco e detriti, non altera la morfologia cellulare e assicura la rappresentazione statistica di tutti i citotipi presenti nel campione. Consente la riproducibilità dell'esame. ·
2. raccolta delle cellule: grazie ad uno speciale microprocessore viene controllato il flusso della fase liquida, controllando la distribuzione di cellule in monostrato ed il loro numero (50-70000).
3. trasferimento delle cellule: controllato dal microprocessore, elimina il liquido filtrato e mantiene l'aderenza delle cellule sulla membrana del filtro; questo successivamente viene appoggiato sul vetrino e le cellule, spinte da una pressione positiva, vengono trasferite sul vetrino riempiendo un'area circolare di circa 20 mm. di diametro. A tal punto, dopo la fissazione, si procede alla colorazione di Papanicolau e alla lettura al microscopio.

Senza quindi nulla togliere all'utilità ed al valore del PAP test quale strumento di screening, lo sforzo della comunità scientifica internazionale è volto allo sviluppo di tecnologie che possano ottimizzare ed affiancare le procedure convenzionali di prevenzione.

L'uso di test per l'identificazione di ceppi di HPV ad elevato potenziale oncogeno sembra essere un efficace strumento di prevenzione secondaria nel migliorare la gestione clinica in primis delle pazienti con PAP test moderatamente alterato (LSIL) o atipico (ASCUS).

Un metodo oggettivo, quale la identificazione di HPV, sembra offrire un elevato potere predittivo di lesione sia per il valore negativo che per il valore persistentemente positivo per il quale è stato dimostrato un rischio di evoluzione neoplastica a due anni di circa 200 volte rispetto alle donne negative.

La diagnosi di infezione da HPV si basa quasi esclusivamente sulla identificazione degli acidi nucleici virali in preparati ottenuti da campioni

biologici prelevati in sede idonea, mediante tampone endocervicale, conservato in una soluzione di trasporto contenente antibiotici. Non è infatti possibile coltivare il virus e la diagnosi indiretta, cioè la ricerca di anticorpi nel sangue periferico, non fornisce risultati soddisfacenti perché transitoriamente determinabile e di difficile attuazione dal punto di vista tecnico per la mancanza di antigeni rappresentativi di ogni tipo virale di interesse clinico. La maggior parte dei test sierologici sono stati infatti sviluppati esclusivamente per la diagnosi dei ceppi maggiori (HPV 16 e 18).

2.11.2 METODI MOLECOLARI

Si basano su tecniche in grado di mettere in evidenza il DNA virale e possono fornire informazioni sulla presenza di HPV ad alto e basso rischio oncogenico e/o di uno specifico sottotipo. Tre sono le tecniche utilizzabili e diversi sono i principi che stanno alla base della loro capacità di mettere in evidenza il virus:

- Ibridizzazione diretta
- Ibridizzazione in soluzione (Hybrid Capture II)
- Test di amplificazione genica (PCR)

2.11.2a Ibridizzazione diretta

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

principali che sfruttano il principio dell'ibridizzazione diretta: il "Southern blot" e "l'ibridizzazione in situ".

Il Southern blot è stato il primo metodo nello studio degli HPV ed è stato considerato per lungo tempo il "metodo di riferimento". La metodica del Southern blot prevede la digestione del DNA, estratto dal campione, con enzimi di restrizione, i frammenti ottenuti vengono separati mediante elettroforesi, denaturati in situ e trasferiti su filtro di nitrocellulosa (verso il quale il DNA presenta alta affinità). Successivamente si aggiunge al sistema una sonda marcata con traccianti radioattivi, ed in seguito alla reazione di ibridazione (nella quale la sonda legherà il frammento di DNA ad essa complementare presente sul filtro di nitrocellulosa), si procede alla visualizzazione mediante autoradiografia. Il metodo risulta lungo e laborioso, richiede l'impiego di una grande quantità di DNA ad alto peso molecolare ma soprattutto, implica l'uso di materiale radioattivo [Molijn A, 2005].

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

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

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

2.11.2b Ibridizzazione in soluzione

Il test commerciale più diffuso è denominato Hybrid Capture II (Ibridizzazione in soluzione) ed è un test che consente la simultanea determinazione di ceppi attraverso l'ibridizzazione in fase liquida di DNA

virale eventualmente presente nel campione con una miscela di sonde ad RNA (Fig.15).

Sono disponibili 2 pool di sonde che riconoscono rispettivamente HPV ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) e HPV a basso rischio (6, 11, 42, 43, 44). I pool possono essere utilizzati simultaneamente nel caso si desideri una diagnosi generica di infezione da HPV o singolarmente, se la discriminante del livello di rischio oncogeno fosse determinante.

Il principio fondamentale di tale sistema è che il DNA di HPV, se presente, si lega con specifiche sonde a RNA, creando degli ibridi RNA/DNA molto stabili. Questi ibridi vengono catturati da anticorpi universali legati ad un fase solida (micropiastra). I complessi così formati vengono evidenziati con anticorpi monoclonali coniugati alla fosfatasi alcalina. Il segnale che ne risulta è amplificato di almeno 3000 volte e viene evidenziato con un substrato chemiluminescente e misurato da un luminometro. L'intensità di luce emessa, espressa in RLU (Relative Light Units), è proporzionale al quantitativo di DNA virale presente nel campione. Questa lettura fornisce un dato semiquantitativo sulla carica virale presente. È l'unico test HPV approvato del FDA (Food and Drug Administration, USA); non consente la definizione dello specifico tipo di HPV presente [Castle PE, Lorincz AT, 2002].

Fase: Denaturazione

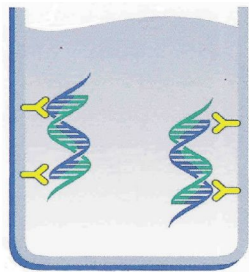
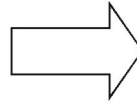


gli acidi nucleici vengono incubati per 45'-90' a 65° in soluzione denaturante

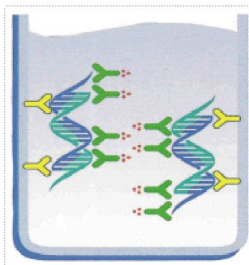
Fase: Ibridazione



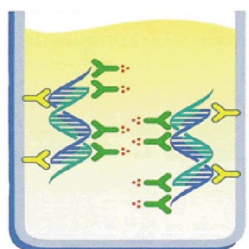
Il DNA denaturato viene Ibridato con sonde di RNA in fase liquida (60' a 65°)



Fase: Cattura degli ibridi
RNA/DNA in fase solida (in micropiastra, 60' a TA)



Fase: Rivelazione
con reazione degli ibridi catturati e Ab coniugati multipli
(30' a TA lavaggio - 15' a TA al buio)



Fase: Misurazione
Il segnale chemiluminescente viene rilevato tramite luminometro
Durata HC2 ® test: 4,30h-5h

Figura 15: principio del sistema Hybrid Capture II.

2.11.2c Test di amplificazione genica

I test di amplificazione genica PCR invece, sono ampiamente utilizzati e sono disegnati in modo da consentire l'individuazione del genotipo.

La PCR è una amplificazione enzimatica in vitro di una definita sequenza di DNA. In base alla sequenza di DNA che si vuole amplificare, indicata come DNA target, vengono sintetizzati due oligonucleotidi di DNA a singolo filamento, indicati come primers, complementari ai due estremi del segmento target. I due primers non devono essere complementari tra di loro per non formare dimeri. Al loro interno non devono essere presenti sequenze complementari che potrebbero unirsi ad anello. La reazione di PCR è caratterizzata da una serie di cicli a diverse temperature: ogni ciclo di può dividere in 3 step che possono essere ripetuti più volte:

- 1. Denaturazione al calore del DNA*
- 2. Annealing: i primers si legano in modo complementare alle estremità 3' e 5' del DNA da amplificare*
- 3. Estensione del filamento con Taq polimerasi.*

L'amplificato si accumula in modo esponenziale raggiungendo un plateau che dipende dalla quantità del DNA di partenza (Fig.16). L'avvenuta amplificazione indica la presenza o meno dell' HPV.

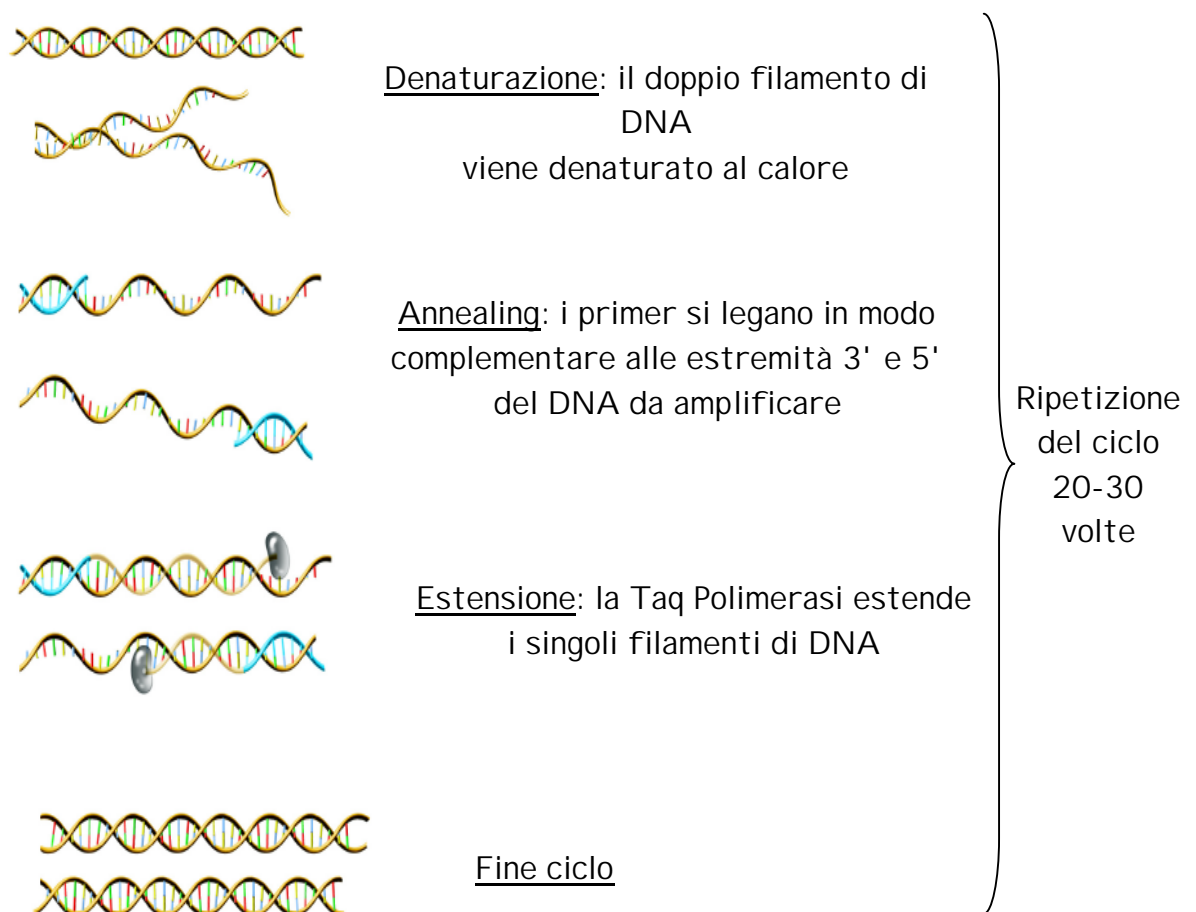


Figura 16: fasi della PCR.

La PCR è dunque la tecnologia di base per tutti i metodi di tipizzazione.

Una volta che la reazione di amplificazione è avvenuta, l'identificazione di genotipi HPV può essere eseguita in vari metodi tra i quali:

- a. RFLP (restriction fragment length polymorphism)
- b. Lipa (line probe assay)
- c. Sequenziamento

2.11.2d Metodo del pirosequenziamento

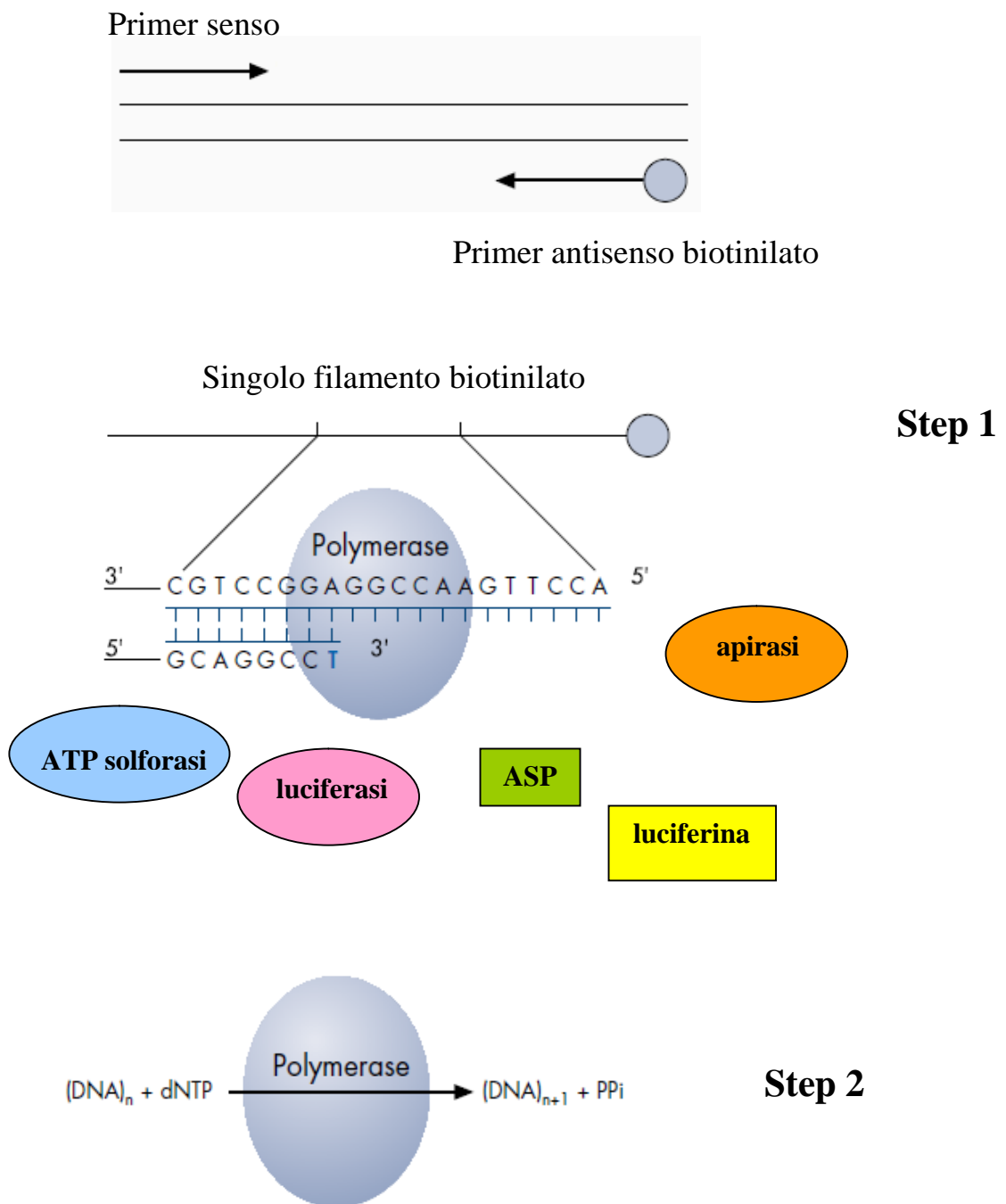
Questo metodo [HPV Sign- Diatech] si basa sul dosaggio del pirofosfato liberato in seguito all'attacco di un dNTP al filamento polimerizzato. Il pirosequenziamento è una tecnica per il sequenziamento del DNA e consta di 5 step principali (fig.17):

1. la sequenza da analizzare, dopo essere stata amplificata con la PCR, viene incubata come singola elica insieme agli enzimi DNA polimerasi, ATP solforilasi, luciferasi e apirasi e ai substrati adenosinsolfosfato (ASP) e luciferina.
2. uno dei 4 dNTP è aggiunto alla reazione. La DNA polimerasi catalizza l'aggiunta di tale base solo se è complementare con il residuo del template. In tale caso si ha concomitante liberazione di pirofosfato inorganico Ppi.
3. il Ppi così prodotto viene trasformato in ATP, ad opera della solforilasi e usando l'ASP come substrato. L'ATP ottenuto consente la conversione della luciferina ad ossiluciferina ad opera della luciferasi con produzione di un segnale luminoso che viene rilevato da un'apposita camera fotosensibile (CCD).
4. l'enzima apirasi degrada il dNTP che non è stato incorporato e l'ATP dalla solforilasi. Solo quando la degradazione è terminata si aggiunge un secondo dNTP per far progredire la reazione di polimerizzazione (ritornando allo step 1).
5. si aggiungono ciclicamente tutti e 4 i dNTPs fino alla deduzione completa della sequenza.

Il segnale luminoso prodotto ogni volta dalla luciferina viene registrato in un apposito “pirogramma”. Il segnale sarà proporzionale all'ATP prodotto e quindi al nucleotide inglobato; un picco di intensità doppia, ad esempio, rileva che nello stesso ciclo sono stati inglobati 2 dNTPs (ripetizione della stessa

base sul template). Viceversa un segnale nullo indica che il dNTP aggiunto in quel ciclo non è complementare.

Si noti che non si può utilizzare l'ATP come dNTP da introdurre per la polimerizzazione, altrimenti non si riuscirebbe a capire se il segnale rilevato proviene da una corretta incorporazione del nucleotide o dall'attività intrinseca dell'ATP. Si utilizza in alternativa l'adenosina-tio-trifosfato, che è riconosciuta dalla DNA polimerasi come se fosse ATP, ma non dalla luciferasi.



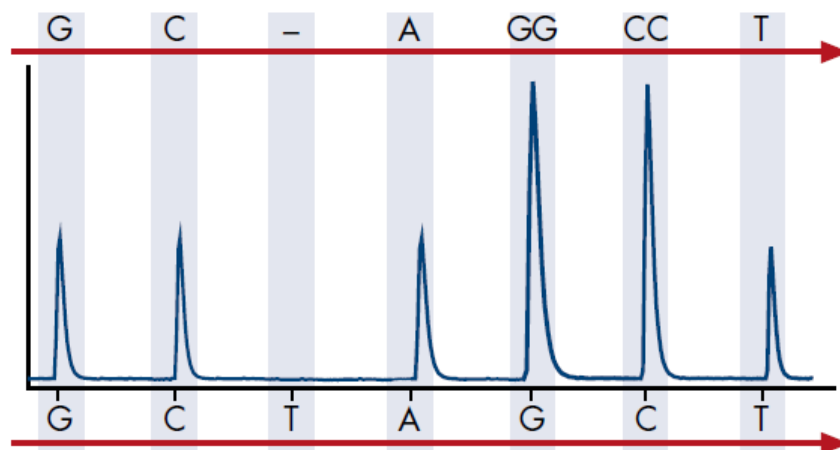
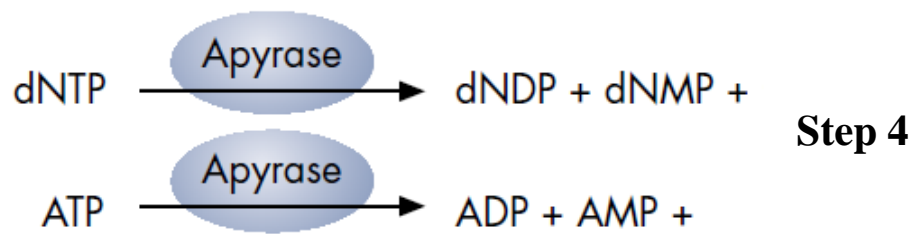
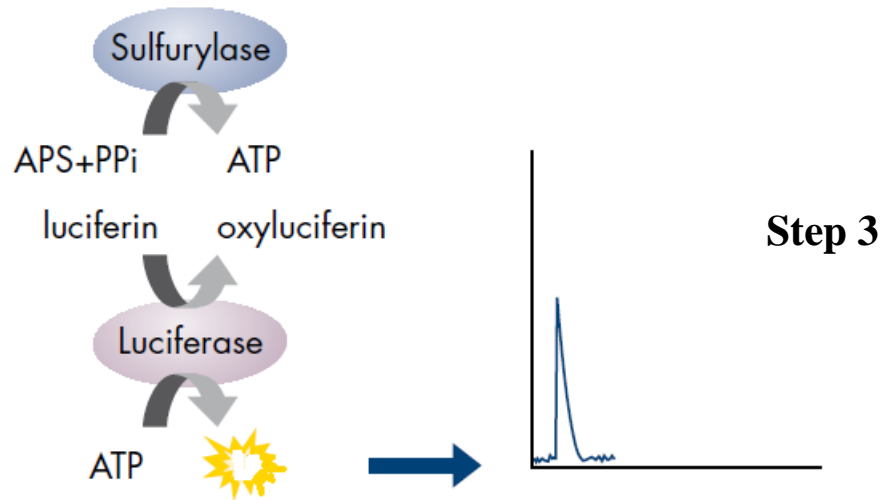


Figura 17: fasi del pirosequenziamento.

CAPITOLO 3

OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo dello studio consiste nell'analisi della prevalenza di HPV in pazienti sani e/o con patologie a livello genitale, soprattutto di sesso femminile ed afferenti ai presidi socio-sanitari delle province di Massa e Carrara. Lo studio verte su campioni raccolti nel periodo 2009-2010. L'indagine è condotta su tamponi provenienti da differenti sedi dell'apparato genitale (cervico vaginali, e/o balano prepuziali). L'identificazione di HPV come causa necessaria per lo sviluppo del carcinoma della cervice e la rilevazione dei diversi tipi di HPV con diverso potenziale oncogeno, mediante tecniche molecolari, hanno reso possibile lo studio di nuove strategie nello screening, basate su test molecolari che possono permettere di individuare con maggior accuratezza le donne che rischiano di sviluppare una lesione di alto grado o un carcinoma invasivo della cervice uterina. Questi dati verranno in seguito utilizzati per verificare se i test da noi usati hanno una sensibilità superiore rispetto al Pap-test (Thin-prep). Ipotesi molto probabile visto che ad una prima analisi su 289 campioni risultati negativi con Thin-prep, 85 sono risultati positivi alla PCR, 192 negativi e 12 non idonei.

Altro obiettivo è determinare la validità di questo test per individuare tra le donne della provincia di Massa e Carrara con un Pap-test di incerto significato o di risultato negativo, quelle che con maggiore probabilità svilupperanno una neoplasia confermata istologicamente. Lo studio cercherà infine di capire se la probabile maggiore sensibilità del test HPV-DNA si traduce in una maggiore prevenzione del cervico carcinoma. A questo proposito sono in corso delle ricerche pilota che prevedono l'introduzione del test HPV come test primario per lo screening. L'impostazione scelta è dettata dalla necessità di non creare falsi allarmismi in donne giovani ed in cui la probabilità di regressione dell'infezione è molto alta.

E' da considerare infine che la prevenzione del carcinoma della cervice si attua con vaccinazione profilattica, per la quale la tipizzazione molecolare di HPV sarà estremamente utile nel monitoraggio delle donne vaccinate.

CAPITOLO 4

MATERIALI E METODI

4.1 PAZIENTI

Nello studio sono stati esaminati 1710 tamponi genitali inviati presso il laboratorio di Immunologia dell'Azienda USL 1 di Massa e Carrara negli anni 2009/2010. Nel 2009 i test sono stati svolti su 599 campioni di provenienza ambulatoriale, mentre i 1111 campioni dell'anno 2010 provengono sia dagli ambulatori che dal programma di screening. I tamponi sono stati analizzati per la ricerca e la genotipizzazione degli HPV.

L'intera procedura di analisi dei campioni per la ricerca di HPV effettuata presso il nostro laboratorio prevede:

1. estrazione degli acidi nucleici con sistema automatizzato
2. amplificazione dell'estratto mediante una PCR-REAL-Time Multiplex e identificazione dei prodotti di PCR specifici mediante analisi di melting
3. purificazione degli amplificati risultati positivi
4. pirosequenziamento

4.2 ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

Dai campioni cervico-vaginali originali coinvolti nello studio sono stati prelevati 5ml conservati in ThinPrep PreservCyt solution. Il prelievo viene centrifugato a 4.000 rpm per 5 minuti e il pellet risospeso in 400-1000ml di tampone a seconda della cellularità del campione. Viene quindi effettuata l'estrazione del DNA seguendo la istruzioni descritte nel kit Helix DNA Plus e utilizzando l'estrattore automatico X-tractor Gene e il protocollo di estrazione 400 VC-60VE. Il principio di tale metodo di estrazione utilizzato può essere riassunto con la definizione "Bind-Wash-Elute":

- ⌘ **BIND**: il legame specifico di acidi nucleici liberi in soluzione ad una membrana di fibre di vetro in presenza di un'alta concentrazione salina, dopo la lisi delle cellule ottenuta utilizzando uno specifico buffer di lisi

che contiene: Tris 1M pH8.5; EDTA 0.5M pH 8.0; TWEEN 20.

- ? **WASH:** rimozione dal filtro di materiale contaminante non legato attraverso lavaggio con opportune soluzioni.
- ? **ELUTE:** distacco degli acidi nucleici puri della membrana mediante trattamento con una soluzione a bassa concentrazione salina ed elevato pH.

Questi passaggi portano alla separazione delle proteine dalle molecole di DNA purificato. Il DNA così estratto viene eluito in un volume finale di 60ml.

4.3 AMPLIFICAZIONE GENICA

L'amplificazione del DNA viene effettuata mediante PCR-REAL-Time Multiplex utilizzando una molecola fluorescente che si chiama SYBR Green, la quale si lega al solco minore del DNA. All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, primers, la molecola fluorescente, i primers per la β -globina, la Taq Polimerasi, i dNTPs e il buffer di reazione. Dopo l'annealing dei primers si legano poche molecole fluorescenti alla doppia elica. Durante l'elongazione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde ad un aumento di copie dell'amplicone. Tutto ciò viene eseguito attraverso il termociclatore Rotor-Gene 6000 alle seguenti condizioni:

- ? 95° per 30 secondi
- ? 44° per 30 secondi
- ? 72° per 30 secondi

Per un totale di 50 cicli secondo il protocollo del kit HPV-Sign (DIATECH). Tale kit permette la rilevazione di una regione altamente conservata del virus HPV: la regione L1 e del gene beta globina come controllo interno per valutare l'integrità del DNA. Il kit di amplificazione consiste in una miscela come indicata nella tabella 4.

Mix di amplificazione	Volume per reazione (ml)
Takara 5x R-PCR Buffer(Mg ²⁺ free)	20
Takara dNTP Mixture (10 mM of each dNTP)	2
Takara 50 mM Mg ²⁺ Solution	3
Takara Ex Taq TM HS (5 U/μl)	1
EvaGreen TM Dye (20X in water)	5
HPV/ β-globin primers	3
Water	56
Volume Totale	90

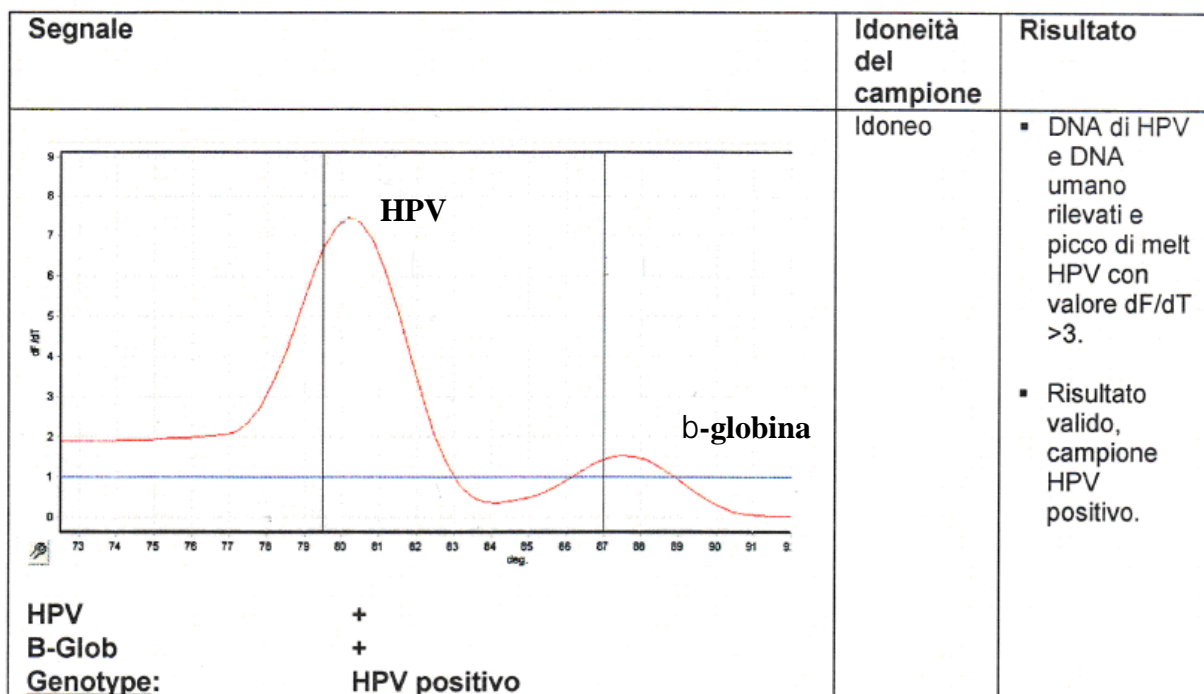
Tabella 4: miscela di amplificazione.

A fine amplificazione, la metodica prevede l'esecuzione di un protocollo di analisi di Melt che permette di verificare la presenza del virus e la quantità del materiale.

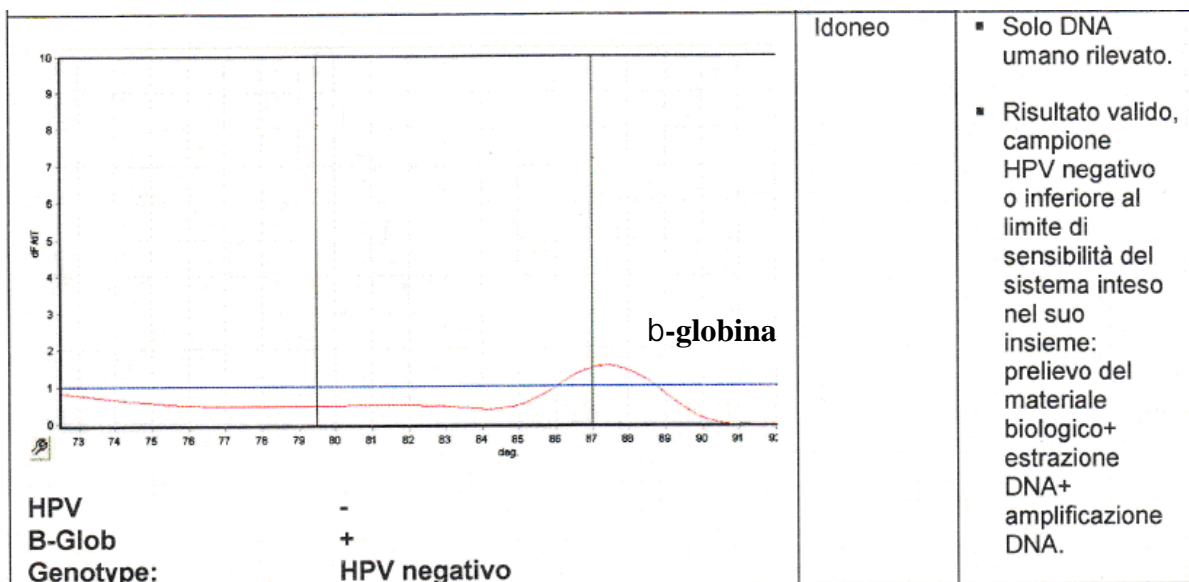
L'analisi della curva di melt mette in relazione il decremento del valore di fluorescenza che si osserva all'aumento della temperatura quando un DNA a doppio filamento (dsDNA), con incorporato un agente intercalante, si dissocia in DNA a singolo filamento (ssDNA).

Per mezzo dell'intercalante EvaGreenTMDye e della sua rampa di melt successiva all'amplificazione, il sistema consente di rilevare picchi di melt specifici per le sequenze di HPV e per il gene umano β-globina, che funge da controllo interno.

I picchi di melt di HPV e della β-globina sono discriminabili tra loro grazie alla diversa temperatura di melting dei frammenti di Dna amplificati (Fig.18 a-b)



a



b

Figura 18: a. analisi di melt di un campione HPV positivo; b. analisi di melt di un campione HPV negativo.

I campioni HPV positivi sono stati poi sottoposti a sequenziamento per la genotipizzazione attraverso la tecnologia del pirosequenziamento previa purificazione.

I prodotti di amplificazione biotinilati sono stati purificati dalla miscela di reazione mediante immobilizzazione su biglie di sefarosio ricoperte da streptavidina (Streptavidin Sepharose HP, GE Healthcare Biosciences AB) utilizzando il PyroMark Q96 Vacuum Workstation (Qiagen).

4.4 IMMOBILIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR

I prodotti di amplificazione biotinilati sulle biglie di sefarosio ricoperte da streptavidina vengono immobilizzati effettuando i seguenti passaggi a temperatura ambiente:

- agitare il contenitore con le biglie di sefarosio fino ad ottenere una soluzione omogenea
- considerare che ogni campione (esclusi i tre controlli positivi HPV ½ pos ctrl, HPV 3 pos ctrl e HPV 4 pos ctrl) deve essere sequenziato con HPV 1 seq primer, HPV 2 seq primer, HPV 3 seq primer e HPV 4 seq primer
- preparare la miscela di immobilizzazione (Binding-Mix), secondo il seguente schema:

Binding - mix	Volume per reazione (ml)
MB water	20
SEQ binding buffer	37
Biglie di sefarosio	3
Volume totale	60

- mescolare per inversione la Binding-Mix e dispensarne 60 µl in ciascuno dei pozzetti della Sample preparation plate che si vogliono utilizzare
- aggiungere nei rispettivi pozzetti, secondo l'ordine definito nella Sequencing grid:
 - 20 µl di amplificazione da campioni clinici;
 - 20 µl di amplificazione da controllo negativo di amplificazione;
 - 20 µl di amplificato da ciascun controllo positivo di amplificazione;

volume totale Binding-Mix più prodotto di amplificazione: 80 µl
- coprire tutti i pozzetti utilizzati della Sample preparation plate con un Sample preparation foil
- mettere la Sample preparation plate in agitazione per almeno 15 minuti a 1.400 rpm o, comunque, fino a quando non si procede con la denaturazione dei prodotti di amplificazione.

-

4.5 PREPARAZIONE PIASTRA DI SEQUENZIAMENTO

Nella preparazione della piastra per il sequenziamento, si procede con la seguente modalità:

- preparare le miscele di sequenziamento (Annealing-Mix), per ognuno dei 4 primers di sequenziamento, secondo questo schema:

Binding - mix	Volume per reazione (ml)
SEQ annealing buffer	38
HPV 1 seq primer oppure	2
HPV 2 seq primer oppure	
HPV 3 seq primer oppure	
HPV 4 seq primer	
Volume totale	40

- Mescolare accuratamente le 4 Annealing-Mix preparate pipettando ripetutamente
- dispensare 40 µl di ogni Annealing-Mix in ciascuno dei rispettivi pozzetti della PyroMark Q96 Plate Low (Qiagen), oppure dell'equivalente PSQ 96 Plate Low (Biotage AB)

4.6 DENATURAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE IMMOBILIZZATI

La purificazione dei prodotti di amplificazione immobilizzati è ottenuta con il seguente procedimento:

- ? lavaggio in etanolo 70%
- ? denaturazione del DNA con SEQ denaturation solution
- ? lavaggio in SEQ washing buffer per rimuovere i filamenti complementari non immobilizzati.

4.7 ANNEALING DEI PRIMER DI SEQUENZIAMENTO

- Porre la Plate Low con i campioni sulla Thermoplate Low ed incubare su blocco termostato a 90°C per 2 minuti
- spostare immediatamente la Plate Low sulla seconda Thermoplate Low ed incubare sul secondo blocco termostato a 60°C per 10 minuti
- rimuovere la Plate Low dalla Thermoplate Low e lasciarla raffreddare a temperatura ambiente per 5 minuti
- porre la Plate Low nell'apposito alloggiamento del PyroMark ID e procedere con la reazione di sequenziamento.

4.8 PIROSEQUENZIAMENTO

Dopo la reazione di amplificazione genica per l'HPV, il metodo di sequenziamento molecolare da noi usato è stato quello del pirosequenziamento nucleotidico [HPV Sign-Diatech] (vedi paragrafo 1.11.2d).

Le reazioni di sequenziamento sono state effettuate utilizzando PyroMark Q96 ID system (Qiagen)(Fig.19).

L'analisi dei risultati e l'identificazione del genotipo sono stati effettuati mediante PyroMark Identify SW 1.0 (Qiagen) (Fig.20), che analizza, allinea e confronta la sequenza ottenuta con una library di tutte le sequenze note dei vari tipi di HPV.

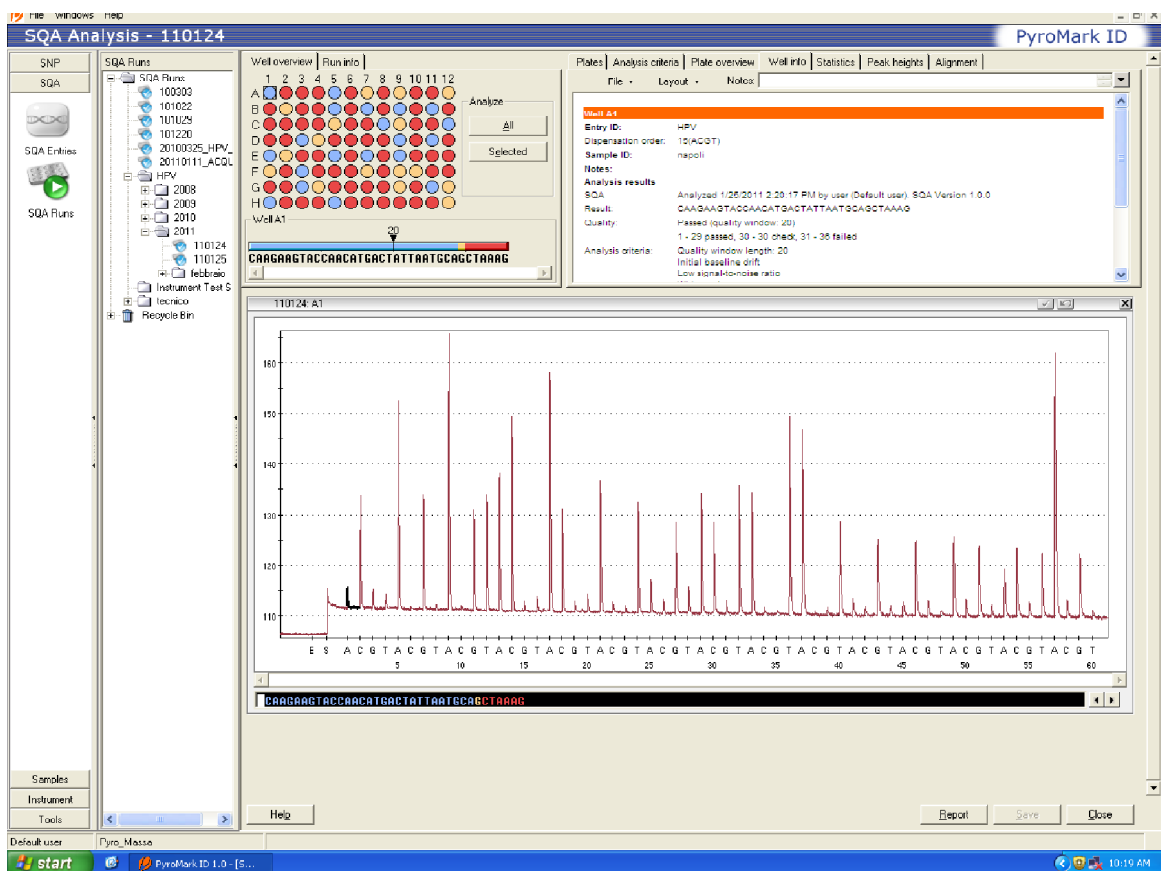


Figura 19: risultato di sequenziamento di un campione positivo.

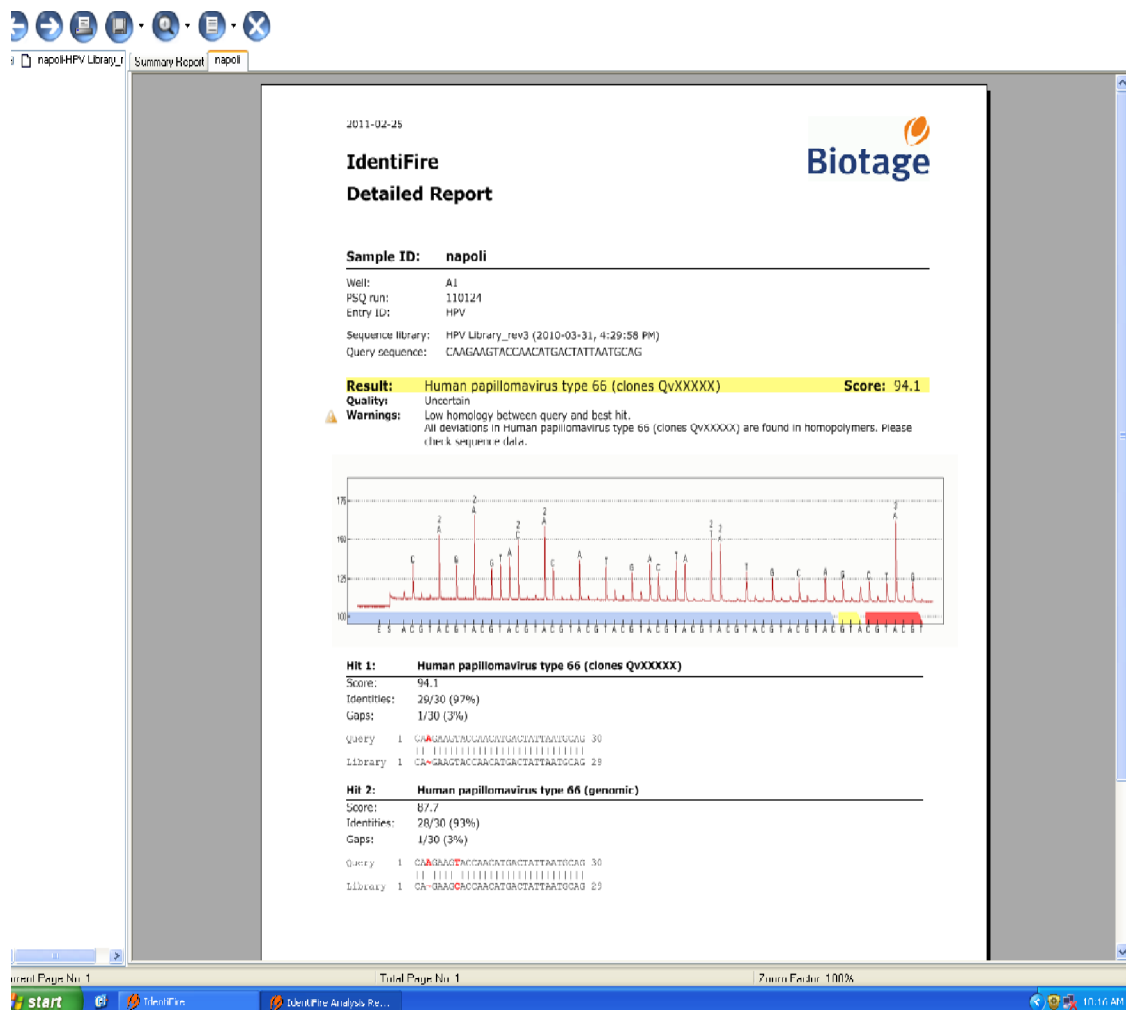


Figura 20: confronto della sequenza di un campione positivo con library HPV mediante software IdentiFire.

4.9 ANALISI STATISTICA

Data la natura prevalentemente qualitativa dei dati, l'analisi statistica è stata condotta con il test χ^2 utilizzando R (<http://cran.r-project.org/bin/windows/base>), un programma di statistica open source. La significatività statistica delle differenze è stata considerata sufficientemente attendibile per valori di p inferiori a 0,05.

CAPITOLO 5

RISULTATI

In questo studio sono stati esaminati 1710 campioni raccolti nel periodo compreso tra gennaio 2009 e dicembre 2010 ed inviati da reparti, ambulatori e centri prelievi dell'Azienda USL1 di Massa e Carrara. I campioni sono stati studiati per identificare la presenza dell'HPV mediante PCR-Real-Time Multiplex basata sulla regione L1 del genoma virale.

L'analisi dei risultati e l'identificazione del genotipo sono stati effettuati mediante PyroMark Identifire SW 1.0 (Qiagen), che analizza, allinea e confronta la sequenza ottenuta con una library di tutte le sequenze note dei vari tipi di HPV (vedi paragrafo 3.8).

I campioni consistevano in 531 Thin-Prep e 1179 tamponi genitali sia di pazienti maschili che femminili.

Come mostrato dalla tabella 1, dei 599 campioni testati nel 2009, 403 sono risultati positivi; di questi 388 erano tamponi dell'apparato genitale femminile e 15 dell'apparato genitale maschile mentre 195 sono risultati negativi (186 femmine e 9 maschi).

Tabella 1. Campioni analizzati nel 2009 e distribuzione per presenza di HPV.

	Frequenza assoluta		
	Femmine	Maschi	Tot
Positivo	388	15	403
Non rilevabile	186	9	195
Non idoneo	0	1	1
Tot	574	25	599

Analizzando la distribuzione di frequenza dei campioni positivi e negativi per classi di età, si evince dalla tabella 2 che nel 2009 la frequenza di positività maggiore (127 campioni su 380 positivi) risulta nell'età compresa tra ventisei e trentacinque anni con una percentuale del 33%. La seconda fascia con il maggior numero di positivi è invece quella compresa fra i trentasei e quarantacinque anni (frequenza di 105 campioni su 380) con una

percentuale del 28%. La frequenza di positività diminuisce all'aumentare dell'età e nei giovani al di sotto dei 25 anni. In accordo con i dati di letteratura (Bulkman et al., 2007), la frequenza di infezione si riduce in modo statisticamente significativo per età superiore ai 35 anni.

Tabella 2. Distribuzione di frequenza nella popolazione femminile per classi di età *

Classi di età	P	NR	Tot	% Positivi
<= 25	75	26	101	20
26- 35	127	47	174	33
36 -45	105	68	173	28
46- 55	58	30	88	15
>55	15	8	23	4
Tot	380	179	559	100

* Non sono state incluse otto pazienti perché non riportavano la data di nascita.

La diminuzione della frequenza è statisticamente significativa tra le classi di età < 25 – 35 e sopra i 35 anni (p=0.0058)

Per quanto riguarda la distribuzione di frequenza dei genotipi virali ad alto e basso rischio nella popolazione femminile (Tabella 3), dei 380 campioni positivi, 272 sono risultati infettati da genotipi di HPV ad alto rischio, mentre 38 presentano un genotipo di HPV considerato a basso rischio oncogeno.

Nel conteggio non sono comprese le confezioni ed i campioni per i quali non è stato identificato il genotipo.

Come per la tabella 2, dalla stessa distribuzione rapportata alle classi di età risulta che la maggior frequenza di genotipi ad alto rischio si ha nella fascia tra ventisei e trentacinque anni con una frequenza di 98 positivi seguita dalla fascia trentasei e quarantacinque anni con una frequenza di 80 positivi. In

questo caso però non viene raggiunta la significatività statistica.

Tabella 3. Distribuzione dei genotipi virali singoli a basso ed alto rischio per classe di età nell'anno 2009

Età	Alto rischio	Basso rischio
<= 25	49	10
26 - 35	98	13
36 - 45	80	6
46 - 55	36	8
> 55	9	1
Tot	272	38

Escludendo i campioni maschili, i campioni femminili con genotipo ad alto rischio sono 272. L'analisi della distribuzione per genotipi dimostra che HPV 16 è presente in 162 campioni (59%), 31 in 26 campioni (9,4%), 18 in 22 campioni (8%) ed a seguire gli altri (tabella 4).

Passando all'analisi del 2010, essa comprende campioni provenienti dal programma di screening per la prevenzione dei tumori al collo dell'utero e dagli ambulatori della provincia, per un totale di 1111 tra maschi e femmine. Di questi, 531 sono da soggetti afferenti a presidi sanitari locali per screening preventivo, i rimanenti 580 sono da ambulatori (tabella 5).

Come mostrato nella tabella 6, la frequenza di positività sui 580 campioni, suddivisi in 523 tamponi cervico-vaginali e 57 balano-prepuziale, è risultata di 351 per quanto riguarda i campioni femminili e 20 per i campioni maschili.

Tabella 4. Distribuzione frequenza dei genotipi ad alto rischio

Genotipo	Frequenza assoluta	% Positivi
16	162	59
18	22	8
31	26	9,4
33	6	2,2
35	7	2,6
39	2	0,7
45	3	1
51	2	0,7
56	16	6
58	12	4,3
59	4	1,4
62,68,73,82	1	0,4
73	12	4,3
Tot	275	100

Tabella 5. Totale campioni analizzati nel 2010 suddivisi tra pazienti afferenti agli ambulatori della provincia e città di Massa e Carrara e screening preventivo.

Provenienza	Frequenza assoluta
Screening	531
Ambulatori	580
Tot	1111

Tabella 6. Risultati per presenza HPV in pazienti da ambulatori.

	Frequenza assoluta			% Positivi
	Femmine	Maschi	Tot	
Positivo	351	20	371	64
Non rilevabile	172	37	209	36
Tot	523	57	580	100

Considerando solo i campioni da soggetti di sesso femminile, la frequenza suddivisa per classi di età mostra una maggiore positività per soggetti compresi tra 26 e i 35 anni. Tra questi 113 risultano positivi per HPV, mentre 56 risultano negativi. Nella successiva fascia di età, 36 - 45 anni, 97 campioni sono positivi, 40 negativi. La frequenza è ancora alta nelle giovani inferiori ai 25 anni di età, con 75 positivi e 41 negativi, per poi decrescere nella fascia compresa tra i 46 ed i 55 anni, con una frequenza di 48 positivi e 32 negativi. Nell'ultimo gruppo che comprende le ultra 55enni, la diminuzione è ancora maggiore, con 18 campioni positivi e solo 2 negativi. A differenza dei campioni raccolti nel 2009, la frequenza di positività suddivisa per classi di età non raggiunge differenze statisticamente significative.

Tabella 7. Distribuzione di frequenza per classi di età

Età	Frequenza assoluta			% Positivi
	P	N	Tot	
<= 25	75	41	116	21.4
26 - 35	113	56	169	32.2
36 - 45	97	40	137	27.6
46 - 55	48	32	80	13.7
> 55	18	2	20	5.1
Tot	351	171	522	100

In riferimento alla tabella 8 che suddivide i genotipi virali a basso e ad alto rischio per classi di età, su 283 campioni, 250 sono ad alto rischio. Di questi, 84 sono presenti nella fascia tra i 26 ed i 35 anni, 67 tra i 36 ed i 45, 50 sotto i 25 anni, 35 nella fascia 45/55 per finire con 14 sopra i 55. Nel basso rischio, invece, il totale è di 33 campioni. Continuando ad esaminare la distribuzione di frequenza di genotipi ad alto rischio, troviamo che sempre nei 250 campioni femminili, il genotipo 16 è stato riscontrato in 102 campioni (40,8%), il genotipo 31 in 36 (14,4%), il genotipo 18 in 29 (11,6%), il 33 in 20 (8%) e a seguire altri genotipi in minor frequenza come mostrato nella tabella 9.

Tabella 8. Distribuzione dei genotipi virali a basso ed alto rischio per classe di età nei pazienti ambulatoriali nell'anno 2010

Età	Alto rischio	Basso rischio	Tot
<= 25	50	8	58
26 -35	84	11	95
36 - 45	67	12	79
46 - 55	35	2	37
> 55	14	0	14
Tot	250	33	283

Altri risultati significativi di questo studio, sono i dati ottenuti dalla rilevazioni di HPV dai campioni provenienti dal programma di screening. Come mostrato nella tabella 10, su di un totale di 531 è stata rilevata una frequenza di 525 campioni femminili e 6 maschili. Dei 525 campioni femminili, 453 sono positivi, 72 negativi, mentre i 6 campioni maschili

risultano essere tutti positivi.

Su 522 campioni da soggetti di sesso femminile, 450 sono positivi e 72 negativi. Dei 450 positivi, 149 sono rilevabili nelle donne tra i 26 e i 35 anni, 120 tra i 36 e i 45, 86 sotto i 25 anni, 73 tra i 46 ed i 55, da ultimo 22 sono i campioni sopra i 55. Dei 72 negativi, ne sono stati trovati 22 nella fascia 26/35, 19 tra i 36 e i 45, 14 46/55, 12 sotto i 25 e 5 nella fascia sopra i 55 anni (tabella 11).

Tabella 9. Distribuzione di frequenza dei genotipi ad alto rischio nelle pazienti ambulatoriali nell'anno 2010

Genotipo	Frequenza	% Positivi
16	102	40,8
16 18	5	2
18	29	11,6
31	36	14,4
31 33 34 35 39	1	0,4
33	20	8
35	5	2
39	2	0,8
45	6	2,4
51	1	0,4
51 52 53 56 58 59	4	1,6
52	0	0
54	0	0
56	10	4
58	13	5,2
59	2	0,8
73	14	5,6
Tot	250	100

Tabella 10. Numero dei soggetti analizzati dallo screening di popolazione nell'anno 2010

	Frequenza assoluta			% Positivi
	Femmine	Maschi	Tot	
Positivo	453	6	459	86,4
Non rilevabile	72	0	72	13,6
Tot	525	6	531	100

Tabella 11. Distribuzione di frequenza per classi di età

Età	Frequenza assoluta			% Positivi
	Positivi	Negativi	Tot	
<= 25	86	12	98	19,1
26 - 35	149	22	171	33,1
36 - 45	120	19	139	26,6
46 - 55	73	14	87	16,2
> 55	22	5	27	5,0
Tot	450	72	522	100

Per quanto riguarda invece la distribuzione di genotipi virali a basso ed alto rischio per classi di età, dei 336 campioni 301 sono ad alto rischio, distribuiti come da tabella nelle seguenti fasce di età: 110 per i 26/35, 79 tra i 36 e i 45 anni, 50 per le donne di anni inferiori ai 25, 47 nella fascia 46/55, 15 per le donne sopra i 55. Trentacinque dei 336 campioni totali, sono a basso rischio, presenti per la maggior parte nella fascia di età tra i 36 e i 45 anni (tabella 12). Nessuna di queste distribuzioni raggiunge la significatività statistica.

Tabella 12. Distribuzione dei genotipi virali a basso ed alto rischio per classe di età nella popolazione di screening nell' anno 2010

Età	Alto rischio	Basso rischio	Tot
<= 25	50	7	57
26 -35	110	8	118
36 - 45	79	14	93
46 - 55	47	5	52
> 55	15	1	16
Tot	301	35	336

La distribuzione di frequenza di genotipi ad alto rischio, vede sempre il genotipo 16 presente in 123 campioni su 303, il 18 in 40, i 31 e 33 presenti in 24 campioni per ciascuno ed il 56 in 20 (tabella 13).

Tabella 13. Distribuzione di frequenza dei genotipi ad alto rischio nella popolazione di screening nell'anno 2010.

Genotipo	Frequenza assoluta	% Positivi
16	123	40,6
16 18	7	2,3
18	40	13,2
31	24	7,9
31 33 34 35 39	4	1,3
33	24	7,9
35	6	2
39	1	0,3
45	13	4,3
51	2	0,7
51 52 53 56 58 59	5	1,7
52	1	0,3
54	1	0,3
56	20	6,6
58	13	4,3
59	9	3
73	10	3,3
Tot	303	100

Allo scopo di valutare eventuali differenze nelle distribuzioni dei genotipi tra i vari anni, si evince che i genotipi 16 e 18, da 186 del 2009 sono diminuiti a 137 nel 2010, al quale corrisponde un aumento degli altri genotipi che passano da una frequenza di 180 a 202. La diminuzione vale anche per il solo genotipo 16 per gli anni 2009 e 2010 (tabelle 14 e 15). Tutte le differenze risultano altamente significative dal punto di vista statistico.

Tabella 14. Distribuzione di frequenza dei genotipi 16 e 18 nei campioni raccolti nel 2009 e nel 2010. Per quest'ultimo anno il valore è riferito ai soli campioni da ambulatori.

Genotipo	Frequenza assoluta	
	2009	2010
16 18	186	137
Altri	180	202

La differente distribuzione ha una significatività statistica pari a ($p = 0,0049$).

Tabella 15. Distribuzione di frequenza del genotipo 16 nei campioni raccolti nel 2009 e nel 2010.

Genotipo	Frequenza assoluta		
	2009	2010 ambulatori	2010 screening
16	162	102	125
Altri	204	235	312

La differente distribuzione ha una significatività statistica pari a ($p = 0,0000$).

Per quanto riguarda invece il solo 2010, la frequenza dei genotipi 16 e 18 è risultata maggiore fra i pazienti in screening (170) rispetto a quelli ambulatoriali (137) mentre gli altri genotipi mostrano un andamento inverso. La diversa distribuzione non ha però significatività statistica.

Tabella 16. Distribuzione della frequenza dei genotipi 16 e 18 nella popolazione ambulatoriale e di screening nell'anno 2010

Genotipo	Frequenza assoluta	
	2010 Screening	2010 Ambulatori
16 18	170	137
Altri	257	202

Come atteso dalle elevate significatività delle tabelle viste sopra, il confronto tra il numero di campioni positivi per HPV 16 e 18 raccolti nel 2009 e del totale di quelli raccolti nel 2010 (quindi ambulatori più screening), conferma una netta riduzione del numero di campioni positivi per HPV 16 e 18 tra il 2009 ed il 2010 (tabella 17).

Tabella 17. Confronto della distribuzione di frequenza dei genotipi 16 e 18 negli anni 2009 e 2010

Genotipo	Frequenza assoluta		
	2009	2010 ambulatorio	2010 screening
16 18	186	137	170
Altri	180	202	257

La differente distribuzione ha una significatività statistica pari a ($p = 0,0001$).

CAPITOLO 6

DISCUSSIONE

Il metodo biomolecolare che prevede l'utilizzo della PCR, nella diagnosi di infezioni da HPV, è estremamente utile perché tale tecnica è rapida e di facile esecuzione e, soprattutto, perché estremamente sensibile. Inoltre, la genotipizzazione di HPV che si effettua in caso di positività per il genoma HPV, è un eccellente mezzo di prevenzione/controllo per i tumori della cervice uterina, in quanto possono essere evidenziati i genotipi associati a patologie neoplastiche.

L'applicazione di questa metodica, nel nostro studio, ci ha permesso di raggiungere alcuni risultati interessanti. Abbiamo potuto dimostrare come l'infezione sia estremamente diffusa nella nostra casistica, con una percentuale di positività pari al 67,2% nell'anno 2009 (campioni di provenienza ambulatoriale), 64% e 86,4% nell'anno 2010 (campioni di provenienza ambulatoriale e dal programma di screening rispettivamente). Come detto, i campioni si riferiscono alla popolazione femminile e maschile della provincia di Massa e Carrara. Una così elevata prevalenza di HPV, non diversa dai dati in letteratura (Bosch et al., 2008; Bulkmand et al., 2007; Clifford et al., 2006) può trovare diverse spiegazioni: una di queste potrebbe risultare dal fatto che parte dei soggetti analizzati era stata selezionata in base a criteri clinici, secondo i quali già esisteva una supposta diagnosi di infezione da HPV.

La suddetta spiegazione non è però sufficientemente esaustiva, poiché probabilmente l'utilizzo della PCR ha svolto un ruolo chiave. Tale metodica è risultata fondamentale grazie alla sua accentuata sensibilità che permette di amplificare virus presenti nel campione in basse quantità e di rilevare un elevato numero di diversi genotipi di HPV.

Dall'analisi svolta nei confronti della popolazione femminile, divisa in base a differenti fasce di età, si è riscontrato un dato altamente significativo tra gli anni di riferimento (2009 e 2010), ossia la maggiore positività di infezione nelle giovani donne con meno di 25 anni ed in quelle comprese tra i 26 e i 35 ($p= 0,0058$). Nel 2009, quelle risultate positive al virus sono 202 tra le under

25 e la fascia di età dai 26 ai 35 anni, mentre in età superiore sono 178. Nell'anno successivo invece, lo studio statistico della frequenza di positività tra le varie classi di età e tra le diverse fonti di provenienza, non ci fornisce riscontri di una qualche importanza.

Per quanto riguarda i campioni di derivazione maschile si è statisticamente evidenziato ($p < 0,01$) un aumento dei pazienti di sesso maschile rispetto al 2009, anche se tra di essi la frequenza di positività è minore.

I risultati ottenuti hanno posto l'accento su di una maggior prevalenza di infezioni sostenute da genotipi di HPV considerati ad alto rischio di evoluzione, rispetto a quelli a basso rischio. Tra i genotipi ad alto rischio, il 16 è stato quello più frequentemente isolato (59% nei campioni femminili del 2009, 40,6% per i campioni provenienti da screening e 40,8% per quelli ambulatoriali nel 2010), seguito dal genotipo 18 e dal 31.

E' stato evidenziato però che, con riferimento ai campioni di provenienza ambulatoriale analizzati per gli anni 2009/2010, sia i genotipi 16 e 18 hanno una distribuzione di frequenza maggiore nel primo anno che va poi diminuendo nell'anno successivo. In particolare solo il genotipo 16 è passato da una frequenza di 162 a 102. La diminuzione è supportata da una elevata significatività statistica ($p = 0.0001$). Questa diminuzione è stata soppiantata da un aumento di altri genotipi la cui frequenza aumenta da 180 nel 2009 a 202 nel 2010. Tutto ciò potrebbe essere spiegato con l'introduzione sul mercato italiano del vaccino contro l'HPV, specifico per i genotipi maggiormente oncogeni, ossia il 16 e il 18. Inoltre il vaccino in questione è anche specifico per la protezione da genotipi responsabili dei condilomi, come il 6 e l'11. Anche se, data l'età, non sono stati analizzati soggetti vaccinati, è presumibile che l'inizio della campagna vaccinale nelle adolescenti abbia cominciato a manifestare i suoi effetti con una graduale riduzione dei genotipi 16 e 18 come osservato in screening epidemiologico-molecolari condotti recentemente (Heart, 2011; Lu et al., 2011)

Da ciò consegue come l'identificazione del genotipo infettante da HPV sia una imprescindibile necessità diagnostica ed un importante strumento per l'individuazione del carcinoma della cervice uterina.

Le ricerche eseguite dimostrano che sequenze di HPV di tipi ad alto rischio, sono quasi sempre presenti nei casi di ASCUS associati a CIN2, mentre i casi negativi raramente si associano a lesioni. L'utilizzo della tipizzazione molecolare serve a valutare la presenza dell'infezione in un range di donne sottoposte a controllo come marcatore di rischio di progressione (specialmente per i genotipi 16 e 18). Questo con riguardo a studi epidemiologici per stabilire la prevalenza dei diversi tipi.

In base a tali premesse, l'applicazione del metodo in PCR da noi messo a punto per la ricerca dell'infezione e la successiva genotipizzazione mediante pirosequenziamento, dovrebbe fornire un dato statistico rilevante da inserire in più vasti campi di ricerca. Gli stessi sono finalizzati alla produzione di dati conclusivi che confermino la possibilità applicativa del metodo in programmi di screening di massa, con un interessante rapporto costo-beneficio, ma non solo: la biologia molecolare ci consente lo studio dei genotipi più rilevanti dal punto di vista clinico a partire da un singolo prodotto di amplificazione, con la sicurezza data da una reale sequenza genica. Infatti in circa 2 ore, dopo la PCR, è possibile sequenziare ed identificare fino a 22 campioni diversi confrontando, tramite IdentiFire, le sequenze ottenute con quelle genotipo-specifiche contenute nell'HPV library.

CAPITOLO 7

BIBLIOGRAFIA

- **Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Muñoz N.** Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008; 26 Suppl 10: K1-16.
- **Bulkmans NW, Berkhof J, Bulk S, Bleeker MC, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Snijders PJ, Meijer CJ; POBASCAM Study Group.** High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening. *Br J Cancer*. 2007; 96 (9): 1419-24
- **Castellsague X, de Sanjose S, Agudo T.** HPV and Cervical Cancer in the world. 2007 report. *Vaccine*. 2007; 25 Suppl 3: C27/C219.
- **Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group.** Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98 (5): 303-15.
- **Castellsagué X, Muñoz N.** Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31: 20-8.
- **Castle PE, Giuliano AR.** Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31: 29-34.

- **Castle PE, Lorincz AT, Mielzynska-Lohnas I, Scott DR, Glass AG, Sherman ME, Schussler JE, Schiffman M.** Results of human papillomavirus DNA testing with the hybrid capture 2 assay are reproducible. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3): 1088-90.
- **Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL.** HPV type distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 3: S3/26-34.
- **Culp TD, Budgeon LR, Christensen ND.** Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. *Virology.* 2006; 347 (1): 147-59.
- **De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H.** Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324 (1): 17-27.
- **Del Mistro A, Chieco Bianchi L.** HPV-related neoplasias in HIV-infected individuals. *Eur J Cancer.* 2001; (10): 1227-35.
- **Doorbar J.** Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Clin Sci (Lond).* 2006; 110 (5): 525-41.
- **Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L.** Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 1991; 352 (6338): 824-7.
- **Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM.** Globocan 2002: incidence,

mortality and prevalence worldwide. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2004.

- **Frazer IH.** Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4 (1): 46-54.
- **Heard I.** Human papillomavirus, cancer and vaccination. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011 (4):297-302.
- **Howley, P. M. and D. R. Lowy.** Papillomaviruses and their replication. *Fields Virology, Philadelphia (PA): Lippincott-Raven; 2001; 2197-2229.*
- **HPV Sign – DIATECH,** Manuale d'uso, 2010.
- **Hubbard RA.** Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127(8): 940-5.
- **IARC Working Group.** Human Papillomavirus. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans.* Lyon 2007; vol 90. International Agency for Research on Cancer.
- **Lillo F, Galli L, Lodini S, Taccagni G, Ferrari A, Origoni M.** Extralesional detection and load of human papillomavirus DNA: a possible marker of preclinical tumor spread in cervical cancer. *J Low Genit Tract Dis.* 2008 ; 12 (3): 204-9.
- **Longworth MS, Laimins LA.** The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for

the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.* 2004; 78 (7): 3533-41.

- **Lu B, Kumar A, Castellsagué X, Giuliano AR.** Efficacy and safety of prophylactic vaccines against cervical HPV infection and diseases among women: a systematic review & meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2011 (11):13.
- **Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J.** Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol.* 2003; 77 (19): 10186-201.
- **Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ.** Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005; 32 Suppl 1: S43-51.
- **Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group.** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348 (6): 518-27.
- **Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L.** HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 3: S3/1-10.
- **Palefsky J.** Human papillomavirus infection in HIV-infected persons. *Top HIV Med.* 2007; 15 (4): 130-3.

- **Parkin DM, Bray F.** The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3: S3/11-25.
- **Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S.** Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007; 370 (9590): 890-907.
- **Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop.** The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002; 287 (16): 2114-9.
- **Sterling J, Stanley M, Gatward G, Minson T.** Production of human papillomavirus type 16 virions in a keratinocyte cell line. *J Virol*. 1990; 64 (12):6305-7.
- **Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, Campisi G.** HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol*. 2008; (10): 1681-90.
- **Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N.** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999; 189 (1): 12-9.
- **Zur Hausen, H.** Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell

control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst. 2000; 92
(9): 690-8.

CAPITOLO 8

RINGRAZIAMENTI

RINGRAZIAMENTI

I miei più sinceri ringraziamenti al Prof. Mauro Pistello, al Dott. Massimo Giorgi per avermi aiutata nell'analisi statistica e sostenuta nella stesura della tesi.

Un particolare ringraziamento alla Dott.ssa Silvia Anzilotti per avermi seguito costantemente.

Desidero inoltre ringraziare il Dott. Lauro Giusti, Responsabile dell'Immunologia di Massa e Carrara, la Dott.ssa Gloria Bertacca, la Dott.ssa Stefania Lombardi, il Dott. Andrea Cavazzana, Direttore di Anatomia Patologica per i dati che mi hanno fornito.

Ringrazio la Dott.ssa Mila Panichi, Direttore del Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche dell'Azienda USL1, il Dott. Stefano Rosini, Responsabile dei presidi ospedalieri della Lunigiana e il Dott. Emilio Bertolini, Responsabile dell' U.O. Diagnostica di Laboratorio che mi hanno dato l'opportunità di frequentare il laboratorio di immunologia per dedicarmi alla realizzazione della tesi.

Dedico questa tesi alla mia famiglia e soprattutto a mia figlia Veronica.