



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in
Scienze Ostetriche e Ginecologiche

Ciclo XXVI

Interpretazione dell'HPV-DNA test nel Follow-up
Post-Trattamento di Lesioni della Cervice
Uterina CIN II+

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Tiziana Frusca

Tutor:
Chiar.mo Prof. Bruno Ferrari

Dottorando:
Dott. Alessandro Benegiamo

INDICE

1	INTRODUZIONE	3
1.1	EPIDEMIOLOGIA, FATTORI DI RISCHIO E PATOGENESI	3
1.2	PROTEINE VIRALI E ONCOGENESI	6
1.3	RISPOSTA IMMUNITARIA ALL'HPV	9
1.4	STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE	11
1.5	OBIETTIVO DELLO STUDIO	19
2	MATERIALI E METODI	20
3	RISULTATI	23
4	DISCUSSIONE	30
5	CONCLUSIONI	34
6	BIBLIOGRAFIA	35

1. INTRODUZIONE

1.1 EPIDEMIOLOGIA, FATTORI DI RISCHIO E PATOGENESI

Il carcinoma della cervice uterina è, per frequenza, il terzo tumore maligno nella popolazione femminile. Incidenza e mortalità differiscono notevolmente nelle diverse macroaree mondiali. Ad esempio, in Africa orientale l'incidenza è di 34.5 casi ogni 100.000 donne, con una mortalità di 25.3 casi ogni 100.000 donne; in Europa occidentale l'incidenza è di 6.9 casi/100.000 donne ed una mortalità di 2 casi/100.000 donne (dati 2008) [1]. In Italia, ogni anno circa 3500 donne sviluppano un tumore della cervice, con una incidenza standardizzata per età di circa 10 casi/100.000 donne ed una mortalità standardizzata per età di circa 2 casi/100.000 donne [2].

La quasi totalità di tali neoplasie è associata ad infezione da papillomavirus umano (*human papillomavirus*, HPV) [3]. In particolare, la quota di carcinomi squamocellulari attribuibile a tale infezione è pari al 99.7%, quella di adenocarcinomi al 93% [4-5].

Si stima che oltre il 75% delle donne sessualmente attive contragga l'infezione nel corso della vita, ma questa decorre generalmente in maniera del tutto asintomatica.

In Europa e Nord America, il picco di prevalenza si registra nelle giovani donne di età inferiore ai 25 anni, con il massimo rischio di contrarre l'infezione negli anni immediatamente successivi l'esordio sessuale ed una riduzione dello stesso nel tempo, come conseguenza di una *clearance* spontanea del virus e di un rischio ridotto di reinfezione in epoche successive [6,7].

L'HPV è un piccolo virus a DNA, strettamente specie-specifico, di circa 7900 paia di basi, organizzato in una struttura circolare a doppio filamento, che durante la codifica viene aperta in regioni lineari, chiamate ORFs (Open Reading Frames). Possiamo

suddividere le ORFs in 6 geni non strutturali (Early Regions: E1, E2, E4, E5, E6, E7), 2 geni strutturali (Late Regions: L1, L2) e 2 regioni regolatrici (Upstream Regulatory Region, URR e Long Control Region, LCR) [8].

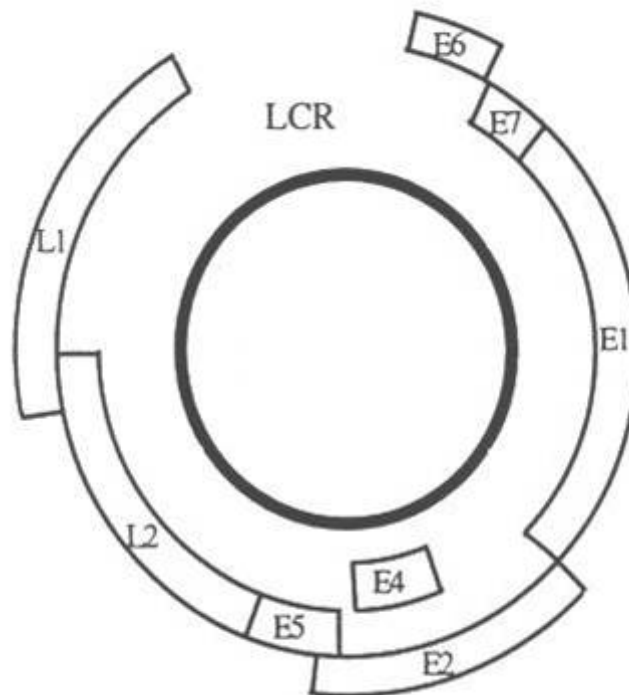


Figura 1. Organizzazione schematica del genoma virale dell'HPV.

Con l'ausilio dell'ingegneria genetica sono già stati tipizzati oltre 120 tipi virali e molti altri ancora, già individuati, sono in attesa di classificazione ufficiale. Per completezza, precisiamo che un nuovo HPV è definito tale se la Open Reading Frame (ORF) del gene L1 differisce di almeno il 10% rispetto al tipo virale già tipizzato ad esso più prossimo. La famiglia degli HPV è ulteriormente divisa in 5 generi, di cui vi sono almeno 40 genotipi che costituiscono il genere ano-genitale. In questo gruppo sono stati individuati genotipi ad alto rischio oncogeno, responsabili di circa il 95% delle neoplasie cervicali, che sono i genotipi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 [9,10]. I genotipi 16 e 18, da soli, sono coinvolti in circa il 70% delle neoplasie cervicali

(il solo HPV 16 è addirittura responsabile di circa il 50% di tali neoplasie) [11]. I genotipi a basso rischio oncogeno 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 e 81 non sono correlati, invece, allo sviluppo di forme cancerose. I genotipi 6 e 11, tuttavia, sono responsabili, da soli, di circa il 90% dei casi di condilomatosi genitale.

Lo studio molecolare delle verruche genitali benigne e dei carcinomi associati all'HPV ha evidenziato una sostanziale differenza nell'azione trasformante di questi virus.

Nelle verruche benigne e nelle lesioni displastiche causate dai genotipi a basso rischio, il genoma dell' HPV rimane allo stato episomiale, ossia non integrato, mentre nei carcinomi, causati da genotipi ad alto rischio, il DNA virale è generalmente integrato nel genoma della cellula ospite. Questo dato indica che l'integrazione virale è fondamentale per la trasformazione maligna. Sebbene il sito di integrazione del DNA virale nei cromosomi della cellula ospite sia casuale, l'integrazione è, invece, di tipo clonale, cioè identica in tutte le cellule che costituiscono una neoplasia. Ciò non accadrebbe se l' HPV fosse semplicemente un patogeno transitorio che infetta cellule già precedentemente trasformate.

Un altro aspetto importante è costituito dal fatto che il sito di interruzione del DNA virale, durante il processo di integrazione, è costante e ricorre quasi sempre all'interno del modulo di lettura aperta ORF E1/E2 del genoma virale [12].

1.2 PROTEINE VIRALI E ONCOGENESI

Il genoma dei diversi tipi di HPV contiene da 6 a 8 ORFs che codificano proteine non strutturali definite "precoci" o Early (E), necessarie per modificare il metabolismo della cellula infettata in funzione delle necessità dell'HPV. Nei papillomavirus umani, le proteine E sono quasi tutte espresse nelle fasi iniziali del ciclo replicativo e sono le uniche sintetizzate nelle cellule basali degli epitelii pluristratificati. Sono essenziali per il mantenimento di elevati livelli di trascrizione del genoma virale e per la sintesi del DNA. Alcune di esse sono direttamente responsabili dell'induzione alla proliferazione delle cellule infettate e della loro trasformazione neoplastica (E5, E6, E7).

L'ORF E1 rappresenta la struttura più conservata tra i differenti tipi di papillomavirus. La proteina da esso codificata è essenziale per la replicazione dell'HPV, in quanto interagisce con la polimerasi alfa del DNA cellulare. A tal proposito appare utile ricordare che l'HPV non ha DNA polimerasi propria. Il sito di legame della proteina E1, localizzato nella porzione prossimale della regione LCR, è costituito da una sequenza palindromica imperfetta di 18 nucleotidi. La bidirezionalità di questa sequenza è un prerequisito essenziale per la replicazione del DNA virale.

L'ORF E2 codifica almeno due o tre fattori di trascrizione, che costituiscono i maggiori regolatori intragenomici dell'espressione virale, formando dimeri a livello di specifici siti di legame. La proteina E2 inibisce la trascrizione di E6 ed E7. Quando il DNA virale si integra con il genoma umano si ha la rottura delle sequenze geniche di E2, che non viene più trascritta correttamente, con conseguente perdita dell'inibizione della trascrizione degli oncogeni E6 ed E7.

La proteina codificata dall'ORF E4, nonostante sia compresa tra le proteine E, viene espressa tardivamente nel ciclo di replicazione virale ed il suo ruolo è legato

all'infezione produttiva. Essa, infatti, si ritrova nelle cellule infettate solo quando il processo di differenziazione è già avanzato ed in coincidenza con gli eventi tardivi del ciclo di replicazione virale. È generalmente associata alla struttura cheratinica delle cellule epiteliali ed è stato ipotizzato che la sua funzione sia quella di cooperare alla fuoriuscita dei virioni neoformati dalla cellula infettata.

Le oncoproteine codificate dagli ORFs E5, E6 ed E7 stimolano la proliferazione cellulare ed aumentano le probabilità di trasformazione neoplastica delle cellule infettate.

L'ORF E5 codifica una oncoproteina di 44 aminoacidi, priva di attività enzimatica intrinseca. Dimeri di E5, con una porzione N-terminale altamente idrofoba, si inseriscono nella membrana cellulare in prossimità dei recettori per il PDGF (Platelet Derived Growth Factor), provocandone l'attivazione indipendente dalla presenza del ligando specifico, e determinando l'innescamento di segnali di moltiplicazione cellulare.

La proteina codificata dall' ORF E6 ha un'azione simile a quella di altre oncoproteine. Si lega al prodotto del gene p53, facilitandone la degradazione attraverso il sistema dell'ubiquitina. Le cellule private della funzione del gene p53 non si arrestano in fase G1 del ciclo cellulare e mostrano instabilità genomica. L'importante ruolo dell'interazione tra E6 e p53 nella patogenesi dei carcinomi della cervice è confermato da studi in cui è stata valutata l'associazione fra i polimorfismi di p53 ed il rischio di sviluppare questo tipo di neoplasia. Una variante di p53, codificata da un allele in cui una arginina sostituisce una prolina, è molto più suscettibile alla degradazione da parte di E6 e, di conseguenza, gli individui che presentano questa variante hanno un rischio di sviluppare carcinomi della cervice 7 volte maggiore rispetto ai soggetti in cui non è presente.

La proteina codificata dall'ORF E7 lega la forma ipofosforilata del prodotto del gene oncosoppressore Rb (proteina del retinoblastoma), spiazzando i fattori di trascrizione E2F, normalmente legati a pRb, con conseguente inattivazione e blocco della normale funzione fisiologica di regolatore negativo della trascrizione.

L'affinità delle proteine virali E6 ed E7 per i prodotti dei geni oncosoppressori p53 e pRb dipende dal potenziale oncogeno dell' HPV: le proteine E6 e E7 prodotte dagli HPV ad alto rischio (come HPV16, HPV18 e HPV31) presentano un'elevata affinità per pRb e p53, mentre quelle prodotte dagli HPV a basso rischio (come HPV6 e HPV11) presentano una bassa affinità per le stesse proteine.

In sintesi, le oncoproteine E5, E6, E7 possono essere considerate, per il loro peculiare meccanismo d'azione, le principali responsabili della moltiplicazione e della trasformazione cellulare [12-17].

1.3 RISPOSTA IMMUNITARIA ALL'HPV

Sia l'immunità umorale che l'immunità cellulo-mediata sono coinvolte nella risposta dell'ospite all'infezione da HPV.

La risposta umorale mira a prevenire l'ancoraggio del virus alle cellule epiteliali ed è principalmente diretta contro i prodotti della regione genomica L1, codificante proteine dell'involucro esterno del virus.

L'immunità cellulo-mediata è solitamente in grado di eliminare la maggior parte delle infezioni da HPV ed è correlata alla possibilità di regressione rapida dei condilomi.

Particolarmente rilevante è la sua azione contro le oncoproteine virali E6 ed E7, la cui espressione è responsabile delle lesioni croniche ad evoluzione verso il cancro cervicale.

Un aspetto peculiare dell'infezione da HPV è il fatto che i tipi virali ad alto rischio inducono, nelle cellule epiteliali, una soppressione della risposta immunitaria locale. Per tale motivo, un'infezione pregressa con un tipo di HPV ad alto rischio non garantisce l'immunità nei confronti di un'infezione successiva.

La maggior parte delle infezioni da HPV sono transitorie e regrediscono spontaneamente nell'arco di 12-30 mesi. Dopo l'infezione il virus non dissemina, ma resta localizzato alla mucosa cervicale, ad indicare che la risposta immune locale è sufficiente a controllare, e spesso a risolvere, l'infezione. Sia la risposta immune cellulo-mediata che quella umorale anticorpale sono, quindi, implicate nell'influenzare la suscettibilità, la persistenza e la risoluzione delle infezioni genitali da HPV [18, 19].

Una risposta immune efficace è rappresentata dalla produzione di linfociti T citotossici in grado di riconoscere e distruggere le cellule infettate, come dimostrato dalla presenza di infiltrati di cellule T in lesioni in via di regressione (linfociti T CD4+ e CD8+ nello stroma e nell'epitelio).

L'immunità cellulo-mediata gioca un ruolo fondamentale nel controllo delle infezioni da HPV; la loro incidenza, infatti, è maggiore negli individui immuno-defedati. Da uno studio caso-controllo condotto in Sud-Africa (Johannesburg, 1995-1999) emerge un lieve, ma significativo, incremento del rischio di cancro della cervice tra le donne HIV-positive, nelle quali il tumore compare in media 10 anni prima, rispetto alle donne HIV-negative [20].

La produzione di anticorpi specifici neutralizzanti, invece, è stata dimostrata solo in una parte dei casi analizzati ed è comunque molto scarsa se comparata a quella della maggior parte delle altre infezioni virali. Nel caso dell'infezione da HPV 16, immunoglobuline specifiche sono rilevabili solo 6-18 mesi dopo l'infezione. Analisi effettuate su campioni sierologici di donne HPV-positive o portatrici di lesioni cervicali HPV-correlate, hanno confermato che nel 20-50% dei casi non si raggiungono livelli anticorpali dosabili. Una possibile interpretazione è che l'infezione da HPV, non inducendo citolisi, non prevedendo una fase viremica e non inducendo una risposta infiammatoria, non evoca segnali di pericolo, non stimola una risposta immune efficace e rende l'ospite immunogenicamente "inconsapevole" dell'infezione stessa [19].

I molteplici meccanismi di evasione utilizzati sono orientati a perturbare la corretta presentazione e processazione dell'antigene al sistema immunitario. La proteina E6 inibisce l'interazione tra la cellula epiteliale e le cellule dendritiche, probabilmente attraverso la deplezione di queste ultime, come si osserva nell'epitelio infettato da HPV; i prodotti dei geni E6 ed E7 bloccano la produzione di interferoni, inattivando prodotti intermedi della loro sintesi, ed inibiscono la risposta cellulare agli interferoni di tipo 1 (IFNs); la proteina E5, inoltre, inibisce la processazione di antigeni peptidici con un meccanismo pH-dipendente [21].

1.4 STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE

L'infezione da HPV avviene nel momento in cui il virus è in grado di raggiungere le cellule dello strato basale dell'epitelio, che hanno proprietà simili a quelle delle cellule staminali.

L'esocervice è rivestita da un epitelio squamoso pluristratificato, non cheratinizzato, definito anche epitelio "originario" o "nativo", diviso in 4 zone:

- *strato basale*, che costituisce la matrice epiteliale
- *strato parabasale*, in cui si osservano rare mitosi cellulari
- *strato intermedio o spinoso*
- *strato superficiale*, dove avviene la completa maturazione cellulare.

Lo *strato basale* è composto da cellule con scarso citoplasma e nucleo ovalare. L'intensa attività mitotica e l'ipercromatismo nucleare rappresentano le caratteristiche distintive.

Lo *strato parabasale* è costituito da cellule più ampie, con citoplasma più abbondante e più rare mitosi.

Lo *strato intermedio o spinoso* è caratterizzato da una progressiva maturazione cellulare, con un graduale incremento del volume citoplasmatico. Le caratteristiche del nucleo permangono invariate sino agli strati superficiali. Le cellule dello strato intermedio non possiedono attività mitotica e sono PAS positive, poiché ricche di glicogeno citoplasmatico.

Lo *strato superficiale* costituisce il compartimento più differenziato dell'epitelio squamoso. Le cellule sono appiattite, il citoplasma ampio ed i nuclei picnotici, assai più piccoli di quelli delle cellule intermedie sottostanti.

La virtuale assenza di desmosomi tra le cellule superficiali spiega la facile desquamazione delle stesse, caratteristica che agevola il prelievo cervicale per l'esame citologico (PAP test).

L'endocervice è, invece, rivestita da un unico strato epiteliale di cellule colonnari, dal tipico aspetto a palizzata, alte ed allungate, mucipare, a secrezione sia apocrina che merocrina. Alcune di esse sono ciliate, con nucleo posto alla base e citoplasma vacuolato contenente muco. Tali cellule si modificano sotto l'influsso ormonale e la loro funzione sembra essere legata soprattutto alla mobilizzazione ed alla distribuzione del muco cervicale. Nell'epitelio endocervicale sono presenti, inoltre, cellule neuroendocrine di tipo argirofilo ed argentaffine, contenenti numerosi ormoni peptidici. In condizioni fisiologiche, a livello dell'epitelio colonnare, non si rilevano mitosi.

Ogni cellula endocervicale rappresenta un'unità funzionale ghiandolare di tipo elementare, poiché nell'epitelio colonnare non si distinguono un sistema escretore ed un sistema duttale.

Il punto di incontro tra i due epiteli, quello colonnare e quello squamoso, prende il nome di giunzione squamo-colonnare [22].

Epitelio squamoso



Epitelio ghiandolare

Figura 2. Epitelio squamoso escervicale, epitelio cilindrico endocervicale, giunzione squamo colonnare.

Questa zona offre all'HPV un'ottimale via di accesso allo strato epiteliale basale dell'epitelio squamoso. Idealmente la giunzione tra i due epiteli coincide con l'orifizio uterino esterno (OUE). La stimolazione ormonale estrogenica durante la pubertà, la gravidanza e l'assunzione di contraccettivi orali provoca uno scivolamento verso l'esterno della giunzione squamo-colonnare, con eversione dell'epitelio endocervicale e formazione di un ectropion, che rappresenta una più vasta zona suscettibile all'infezione da HPV.

A livello vulvare e vaginale, invece, è la presenza di microtraumi epiteliali che facilita il contatto virale con le cellule dello strato basale.

Nelle cellule basali il genoma virale si mantiene allo stato episomiale ed il genoma virale si replica in maniera concomitante con il DNA cellulare, ma in numero limitato di copie. Negli strati soprabasali, cioè quelli più differenziati, la replicazione del DNA virale aumenta, passando da 20-50 copie per cellula dello strato basale a circa 10.000 copie per cellula degli strati più superficiali.

A ciò fa seguito l'attivazione dei geni ad espressione tardiva (L1 ed L2) ed il successivo assemblaggio di particelle virali, al cui interno viene impacchettato il genoma virale, così da costituire nuovi virioni, che andranno ad infettare altre cellule epiteliali tramite il processo desquamativo epiteliale.

Il ciclo replicativo virale a tale livello determina anomalie sia citologiche che istologiche, tra cui la koilocitosi, la papillomatosi e la paracheratosi [5,14,23].

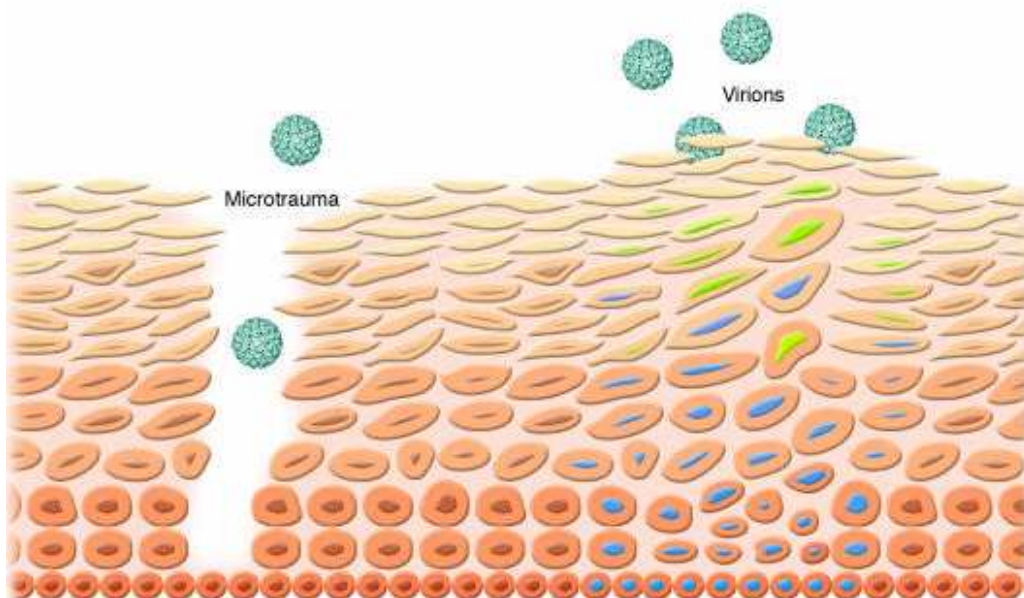


Figura 3. Storia naturale dell'infezione. Modificato da DR Lowry, JT Schiller. *Prophylactic human papillomavirus Vaccines. J Clin Invest.* 2006 May 1; 116(5): 1167-1173.

La maggior parte delle infezioni da HPV si autolimita o è causa di lesioni benigne. Al contrario, un'infezione di lunga durata con genotipi ad alto rischio può condurre allo sviluppo di lesioni neoplastiche preinvasive e, successivamente, a carcinomi francamente invasivi.

L'infezione con genotipi ad alto rischio, di durata non superiore all'anno, può condurre a modificazioni citologiche (L-SIL) ed istologiche (CIN I), il cui esito più frequente è comunque la regressione alla normalità [20,21]. In caso di infezione persistente, entro i

primi 5 anni si possono sviluppare lesioni di grado più avanzato (CIN 2-3), fino ad arrivare, ad oltre 10 anni dall'inizio dell'infezione, al cancro cervicale vero e proprio [23, 25].

La figura 4 offre una rappresentazione del processo multi-step attraverso il quale una lesione non invasiva può evolvere, passando attraverso gradi crescenti di displasia epiteliale: lieve (confinata agli strati epiteliali basali), moderata (estesa agli strati epiteliali intermedi), severa (coinvolgente l'epitelio cervicale in tutto il suo spessore), fino a lesioni cervicali microinvasive ed al carcinoma francamente invasivo [23].

La zona di trasformazione, al confine tra esocervice ed endocervice, costituisce l'area a maggior rischio di insorgenza di cervicocarcinoma, in quanto, a questo livello, il virus riesce più facilmente ad eludere la risposta immunitaria, estrinsecando la propria azione carcinogena.

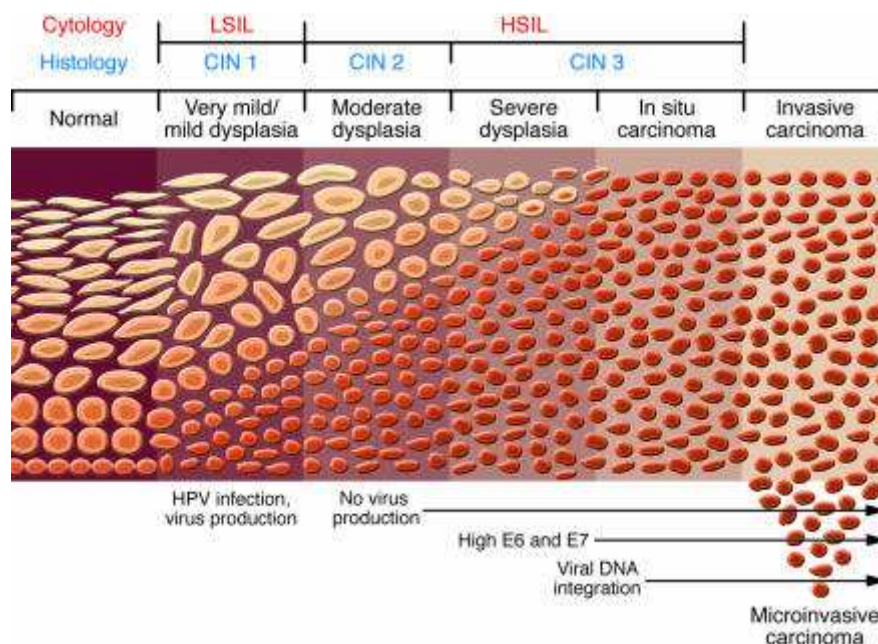


Figura 4. Processo multi-step della trasformazione epiteliale. Tratto da DR Lowry, JT Schiller *Prophylactic human papillomavirus Vaccines. J Clin Invest.* 2006 May 1; 116(5): 1167–1173.

Come già descritto, la curva di incidenza dell'infezione da HPV presenta un picco che coincide con l'inizio dell'attività sessuale (15- 20 anni). Il picco di incidenza delle lesioni precancerose, invece, segue di circa 10 anni quello dell'infezione da HPV: esso è molto inferiore rispetto al precedente, in quanto solo una piccola parte di donne con infezione persistente sviluppa displasia cervicale. La curva di incidenza del carcinoma, infine, segue di circa altri 10 anni quella delle lesioni precancerose, rispecchiando il lungo intervallo di tempo necessario per la progressione delle lesioni displastiche al carcinoma francamente invasivo (Figura 5) [23].

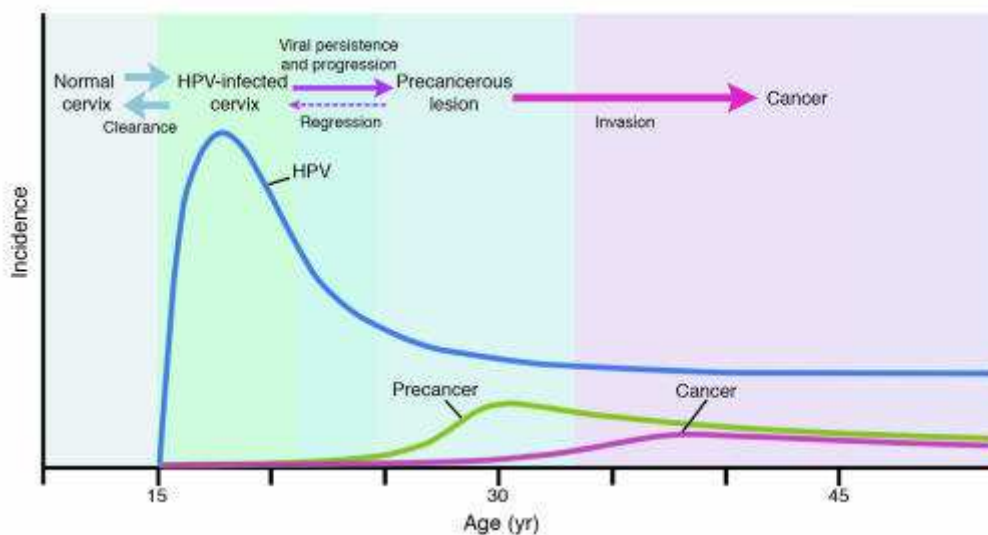


Figura 5. Incidenza dell'infezione virale, delle lesioni precancerose e del carcinoma. Tratto da *DR Lowry, JT Schiller Prophylactic human papillomavirus Vaccines, J Clin Invest. 2006 May1; 116(5): 1167–1173.*

In conclusione, la storia naturale dell'infezione da HPV coincide con quella del carcinoma [26, 27].

L'aver compreso l'esistenza di un nesso causale tra HPV e cancro della cervice ha fatto sì che l'individuazione della presenza di tale virus a livello cervicale assumesse

notevole importanza, sia sotto l'aspetto diagnostico sia per ciò che concerne il management clinico delle lesioni displastiche.

Come riportato da Arbyn M. et al., esistono, al momento, 4 possibili applicazioni cliniche dell'HPV-DNA test nei programmi di screening del carcinoma del collo dell'utero: come test di screening primario, nel triage di anomalie citologiche di basso grado, nel follow-up post-trattamento, nel management dei casi dubbi [28].

Le "Linee Guida della Regione Emilia-Romagna per la diagnosi e la prevenzione dei tumori del collo dell'utero" prevedono ancora l'utilizzo del Pap-test come test di screening, sia con tecnica convenzionale sia su fase liquida, con possibilità di lettura automatica [29].

In alcune realtà della nostra Regione, tuttavia, esistono già rilevanti esperienze nell'applicazione dell'HPV-DNA come test di screening primario: Ravenna, Imola e Bologna, che hanno aderito allo studio multicentrico italiano NTCC; Ferrara e Reggio Emilia, che hanno aderito ai due studi pilota multicentrici nazionali ancora in corso. Le prospettive sono quelle di estendere i risultati di queste esperienze al territorio nazionale.

Le evidenze scientifiche suggeriscono, al momento, che l'uso del test HPV-DNA nello screening primario potrebbe essere efficace solo in donne di età superiore ai 30 anni [30].

Numerosi studi controllati hanno confermato l'utilità della ricerca del DNA dell'HPV nel "trriage" delle lesioni ASCUS. Dal rapporto di Health Technology Assessment del 2012 emerge che, in donne con citologia ASC-US, il test HPV-DNA ha dimostrato sensibilità maggiore e specificità simile alla ripetizione della sola citologia nell'individuare lesioni CIN 2+. L'utilizzo del triage con HPV-DNA nelle donne con

citologia ASC-US è anche raccomandato dalle linee guida italiane del Ministero della Salute 2006 e da quelle europee.

Al contrario, il triage con HPV-DNA nelle pazienti con PAP test L-SIL ha dimostrato bassa specificità. Nello studio NTCC il test ha mostrato specificità maggiore solo se eseguito in donne di età superiore ai 35 anni compiuti [29,31,32].

Altro possibile utilizzo del test HPV DNA riguarda il follow-up post-trattamento.

Le Linee Guida della Regione Emilia Romagna, nel caso sia stato eseguito trattamento con esito istologico CIN 1, prevedono un controllo citologico/colposcopico a 12 mesi. Se negativo, la paziente rientra nello screening.

In caso di follow-up post-trattamento di lesioni CIN2+, nella 3^a edizione (anno 2008) del “Protocollo diagnostico terapeutico dello screening per la prevenzione dei tumori del collo dell’utero nella Regione Emilia-Romagna”[33], si proponeva di introdurre, come opzione alternativa, l’utilizzo dell’HPV-DNA test associato al controllo citologico. Nella 4^a edizione del 2012, invece, si consiglia di introdurre, come modalità prioritaria per il follow-up di queste pazienti, l’esecuzione dell’HPV-DNA test. Pertanto, a 6 mesi dal trattamento, si effettuerà l’HPV-DNA test insieme al Pap test ed alla valutazione colposcopica, peraltro necessaria per la valutazione clinica del caso [29].

Le Linee Guida di follow-up del 2008 per lesioni CIN2+ prevedevano quattro controlli, con PAP Test e colposcopia, a cadenza semestrale. Con l’aggiornamento 2012 si raccomanda, invece, l’utilizzo dell’HPV-DNA test, in associazione alle altre due metodiche già citate, in occasione del primo controllo, effettuato a distanza di 6 mesi dal trattamento escissionale.

1.5 OBIETTIVO DELLO STUDIO

Nonostante l'introduzione delle Linee Guida Regionali 2012, nella nostra realtà l'utilizzo clinico dei protocolli raccomandati risulta ancora di non agevole e uniforme applicazione, come conseguenza dell'ampio spettro di combinazioni cito-colposcopiche riscontrabili durante il follow-up e del relativamente ristretto periodo temporale dall'introduzione routinaria di questo nuovo test diagnostico.

Scopo del nostro lavoro è valutare l'utilità del test HPV-DNA eseguito a 6 mesi dal trattamento, nel follow-up di donne sottoposte a terapia escissionale per CIN2+.

In termini di screening del cancro cervicale, non c'è, al momento, indicazione alla ricerca dei genotipi a basso rischio, per cui ciò che diremo in seguito, in merito all'HPV-DNA test, è da riferire solo ai genotipi ad alto rischio (HR HPV) [34].

2. MATERIALI E METODI

I dati raccolti sono relativi a pazienti giunte all'osservazione del Servizio di Colposcopia e Patologia Cervico-Vaginale del Dipartimento Materno Infantile - Unità Operativa di Ostetricia e Ginecologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma dal 01 Gennaio 2009 al 31 Dicembre 2012. Afferiscono ad esso pazienti con esito non negativo del PAP test di screening o con esame bioptico positivo, per eseguire colposcopia, eventuale trattamento e successivo follow-up, secondo le Linee Guida Regionali [29]. Vi afferiscono, inoltre, le pazienti HIV positive, seguite presso l'U.O. di Malattie Infettive ed Epatologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, le quali, per accordi interni all'Azienda, annualmente eseguono lo screening citologico associato alla colposcopia. Il sistema di refertazione citologica utilizzato fa riferimento alla classificazione del Bethesda System 2001 [35], mentre gli esami colposcopici sono stati effettuati seguendo il sistema di classificazione della International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy (IFCPC) del 2002.

I prelievi citologici ed istologici sono stati esaminati da parte di patologi ginecologi del Dipartimento Patologia e Medicina di Laboratorio Unità Operativa di Anatomia e Istologia Patologica del Centro Diagnosi Precoce Tumori Utero dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma.

Nelle pazienti in cui sono state riscontrate alterazioni cito-colposcopiche l'iter è proseguito con biopsia e/o terapia escissionale, come riportato nelle linee guida della Società Italiana di Colposcopia e Patologia Cervico-Vaginale [36].

Dopo il trattamento, le pazienti sono state invitate a proseguire il follow-up presso la nostra struttura, secondo le Linee Guida Regionali [29].

Alle pazienti avviate per secondo livello con PAP TEST non negativo, in cui non siano emerse alterazioni colposcopiche, è stato effettuato HPV-DNA test cosiddetto “di triage”.

Nel follow-up post-trattamento di lesioni CIN 2+, abbiamo eseguito il test HPV-DNA ad almeno 6 mesi dalla procedura escissionale.

L'identificazione di HPV-DNA mediante reazione polimerasica a catena (PCR) e la successiva tipizzazione dei differenti tipi di HPV è stata effettuata presso il Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, Sezione di Microbiologia. Il kit a nostra disposizione è il test INNO-LiPA HPV Genotyping Extra , ditta produttrice Innogenetics, che permette l'amplificazione di almeno 54 differenti tipi di HPV, e la successiva tipizzazione degli HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69/71, 70, 73, 74, 82.

Tra le pazienti seguite presso il Nostro Servizio, abbiamo selezionato quelle che hanno effettuato HPV-DNA test nel triage di lesioni citologiche di basso grado (ASC-US e L-SIL) e nel follow-up post-trattamento per lesioni cervicali CIN 2+. 112 delle 309 pazienti totali hanno soddisfatto i criteri di inclusione sopra citati; di queste, 11 HIV positive. Delle 112 pazienti totali abbiamo quindi selezionato le 54 pazienti con diagnosi istologica CIN 2+ dopo conizzazione; in questo gruppo, 50 pazienti hanno effettuato HPV-DNA test in aggiunta a PAP test e colposcopia durante il follow-up post-trattamento. Di queste 50 pazienti, 48 hanno effettuato il test a distanza di almeno 6 mesi dal trattamento. In ottemperanza alla Linee Guida Regionali, presso la Nostra U.O. le pazienti con diagnosi CIN 2+ eseguono un primo controllo con PAP test e colposcopia a 6 mesi dal trattamento, quindi PAP test e colposcopia ogni 6 mesi per 2

anni, in caso di follow-up negativo [29]. Abbiamo considerato i risultati dei PAP test e delle colposcopie a 6 e 12 mesi (primo e secondo controllo, rispettivamente). Per le 34 pazienti HPV-DNA negative a 6 mesi abbiamo considerato anche l'esito del terzo controllo (18 mesi dal trattamento, 12 mesi dal test HPV-DNA).

L'obiettivo del nostro studio è stato di valutare Sensibilità, Specificità, Valore Predittivo del test Positivo (VPP) e Valore Predittivo del test Negativo (VPN) del test HPV-DNA nel follow-up delle pazienti sottoposte a conizzazione per CIN 2+, ed in particolare di valutarne l'efficacia in confronto al PAP test ed alla colposcopia.

Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato il pacchetto statistico IBM SPSS versione 2.0 per Windows, che ha consentito il calcolo di media, mediana, i relativi intervalli di confidenza al 95% e gli indici di dispersione principali (varianza, deviazione standard, distanza interquartile). Per le variabili categoriche sono state calcolate le frequenze e le percentuali relative.

3. RISULTATI

La nostra popolazione consta di 112 pazienti totali, di cui 11 HIV positive.

L'età media della popolazione totale in studio è stata $37,91 \pm 9,982$ anni, 95% CI 36,04-39,78, nella popolazione HIV negativa la media è stata $38,22 \pm 10,041$ anni, 95% CI 36,24-40,20, mentre nella popolazione HIV positiva l'età media è stata $35,08 \pm 9,396$ anni, 95% CI 28,78-41,40. Il test di Kruskal-Wallis non ha dimostrato differenze statisticamente significative nell'età media tra sieropositive e sieronegative per HIV. Nessuna delle pazienti HIV positive incluse nello studio presentava una conta linfocitaria $<500/uL$ e tutte erano in terapia antiretrovirale o HAART.

Lo screening è stato effettuato mediante PAP test in tutte le 112 pazienti.

Nel totale dei PAP test di ingresso da screening sono stati riscontrati 52 ASC-US, 38 L-SIL e 22 H-SIL. Nella sottopopolazione HIV positiva gli ASC-US sono stati 5, L-SIL 4, H-SIL 2.

Lo studio dell'associazione tra PAP test di screening e corrispettivo colposcopico di ingresso ha dimostrato che nel 44,2% ASC-US è associato a colposcopia negativa e nel 44,2% a colposcopia grado 1, L-SIL è associato a colposcopia grado 1 nel 65,8% dei casi, mentre H-SIL è associato a colposcopia grado 2 nel 54,5% dei casi (Tabella 1).

24 delle 112 pazienti totali, in seguito alla valutazione colposcopica, non sono state sottoposte a trattamento escissionale o a biopsia; di queste, 20 hanno anche effettuato HPV-DNA test, risultato negativo in 16 pazienti (80%) e positivo in 4 pazienti soltanto.

Le rimanenti 88 delle 112 pazienti incluse nello studio sono state sottoposte a terapia escissionale sotto guida colposcopica. Di queste, 81 pazienti HIV negative e 7 HIV positive. Il referto dell'esame istologico è stato negativo in 4 pazienti (4,5%), CIN 1 in

30 pazienti (34,1%), CIN 2+ in 54 pazienti (61,4%). La tabella 2 riassume le caratteristiche della popolazione sottoposta a trattamento escissionale.

	GRADO COLPOSCOPICO			TOTALE
	0	1	2	
ASC-US	23 (44,2%)	23 (44,2%)	6 (11,5%)	52
L-SIL	8 (21,1%)	25 (65,8%)	5 (13,2%)	38
H-SIL	2 (9,1%)	8 (36,4%)	12 (54,5%)	22
Totale	33	56	23	112

Tabella 1. Associazione PAP test – reperto colposcopico.

		CIN		Totale
		CIN 1	CIN 2+	
Infezione HIV	NO	29	52	81
	SI	5	2	7
Totale		34	54	88

Tabella 2. Esame istologico post-trattamento.

Lo scopo del nostro lavoro è stato di valutare l'efficacia dell'HPV-DNA test nel follow-up post-trattamento di lesioni CIN 2+. Le 54 pazienti, delle 112 totali, che hanno avuto

una diagnosi istologica post-escissionale CIN 2+ costituiscono, quindi, la popolazione oggetto dello studio.

Il PAP test eseguito a 6 mesi è risultato negativo in 47 pazienti, ASC-US in 3 casi, L-SIL in 4, mentre non vi sono stati H-SIL né AGC; il PAP test a 12 mesi è risultato negativo in 46 pazienti, ASC-US in 3 casi, L-SIL in 3, H-SIL in 1 paziente ed AGC in 1 caso. L'unica paziente con PAP test H-SIL non è stata sottoposta a trattamento escissionale in considerazione dell'HPV-DNA test a 6 mesi negativo e dei reperti colposcopici negativi. I successivi controlli sono risultati negativi e la paziente è, ad oggi, in follow-up negativo.

Ad almeno 6 mesi dal trattamento, l'HPV-DNA test è stato eseguito in 48 delle 54 pazienti in studio, risultando positivo in 14 e negativo in 34 pazienti. Il follow-up PAP test, in questo sottogruppo di pazienti HPV-DNA negative a 6 mesi, ha evidenziato 5 PAP test anormali a 6 mesi e 4 PAP test anormali a 12 mesi; 3 pazienti HPV-DNA negative con PAP test anormale a 6 mesi hanno presentato una anomalia citologica persistente di basso grado (L-SIL in 2 pazienti, ASC-US in 1 paziente).

3 delle 34 pazienti risultate negative all'HPV-DNA test sono in seguito state sottoposte a biopsia o ad escissione, in considerazione del riscontro, durante il follow-up, di anomalie citologiche o colposcopiche di non agevole interpretazione. In queste 3 pazienti, i reperti colposcopici sono stati in 2 casi negativi e in 1 caso non soddisfacente per mancata visualizzazione della giunzione squamo-colonnare. L'esame istologico è risultato negativo in 2 casi e CIN 1 in 1 caso. Il successivo follow-up è stato negativo.

In totale, durante il periodo di follow-up, abbiamo sottoposto a ritrattamento 13 pazienti, delle quali 10 hanno presentato una istologia non superiore a CIN 1 e solo 3 una istologia CIN 2+. In 3 di queste 13 pazienti, il test HPV-DNA è risultato negativo.

Nei casi di test negativo l'istologia non è mai stata superiore a CIN 1, mentre, nei 10 casi di test positivo, 3 sono risultate CIN 2+, 6 sono risultate CIN 1 ed in un solo caso l'istologia è stata negativa.

Pertanto, nel sottogruppo delle pazienti ritrattate, si sono verificati 7 casi di test falsamente positivo per CIN 2+ e la totale assenza di falsi negativi per CIN 2+.

Tutte le 34 pazienti risultate negative al test HPV-DNA eseguito a 6 mesi, comprese le 3 pazienti di cui sopra, sottoposte ad accertamento istologico successivo nonostante il test HPV-DNA negativo, si sono confermate negative al successivo (terzo) controllo del follow-up, eseguito con PAP test e colposcopia a distanza di 18 mesi dal trattamento (12 mesi dal test HPV-DNA negativo) e non hanno necessitato di alcun procedimento bioptico.

Abbiamo quindi voluto valutare Sensibilità, Specificità, Valore Predittivo del test Positivo (VPP) e Valore Predittivo del test Negativo (VPN) dell'HPV-DNA test eseguito a 6 mesi dal trattamento chirurgico, nel follow-up delle pazienti con CIN 2+, rispetto ad eventuali recidive nell'arco temporale di 18 mesi dal trattamento. In particolare, abbiamo voluto confrontare la performance dell'HPV-DNA test a 6 mesi con il PAP test a 6 e 12 mesi e con la colposcopia a 6 e 12 mesi. Per questo studio abbiamo considerato negativo solo il PAP test negativo, mentre la colposcopia è stata considerata positiva solo se G2 o insoddisfacente.

Le tabelle 4 e 5 riassumono i dati in termini numerici ed in termini di Sensibilità, Specificità, Valore Predittivo del test Positivo (VPP) e Valore Predittivo del test Negativo (VPN).

	Veri Positivi	Falsi Negativi	Falsi Positivi	Veri Negativi
HPV-DNA test a 6 mesi	3	0	3	34
Colposcopia a 6 mesi	0	3	2	43
Colposcopia a 12 mesi	1	2	2	43
PAP test a 6 mesi	0	3	7	38
PAP test a 12 mesi	2	1	6	39

Tabella 4. Veri Positivi, Falsi Negativi, Falsi Positivi e Veri Negativi riscontrati.

	Sensibilità (SE)	Specificità (SE)	VPP (SE)	VPN (SE)
HPV-DNA 6 mesi	100% (0)	75,56% (6,41%)	21,4% (10,57%)	100% (0)
Colposcopia 6 mesi	-	95,56% (3,07%)	-	93,48% (3,64%)
Colposcopia 12 mesi	33,3% (27,22%)	95,56% (3,07%)	33,3% (27,22%)	95,56% (3,07%)
PAP test 6 mesi	-	84,44% (5,4%)	-	92,68% (4,07%)
PAP test 12 mesi	66,67% (27,2%)	86,67% (5,07%)	25% (15,31%)	97,5% (2,47%)

Tabella 5. Sensibilità, Specificità, VPP, VPN e relativo Errore Standard (SE).
- : dato non valutabile per assenza di casi.

La totale assenza di casi veramente positivi a 6 mesi dal trattamento, se da un lato non permette di valutare Sensibilità e Valore Predittivo del test Positivo a 6 mesi, sia per il

PAP TEST che per la colposcopia, dall'altro può essere interpretato come un indicatore di corretto trattamento.

I nostri risultati dimostrano che HPV-DNA test eseguito a 6 mesi dal trattamento primario è il test con maggiori Sensibilità e Valore Predittivo Negativo, in entrambi i casi del 100%, ma con bassa specificità se confrontato con PAP test e colposcopia.

Confortati dall'elevatissimo Valore Predittivo del test Negativo rilevato nel follow-up post-trattamento, abbiamo voluto valutare la performance dell'HPV-DNA anche come test di triage delle anomalie colpo-citologiche. Ad oggi una delle indicazioni maggiormente condivise [29,31,36] all'esecuzione dell'HPV-DNA test riguarda le pazienti con diagnosi citologica ASC-US. Nella nostra casistica 46 delle 112 pazienti totali hanno effettuato triage con HPV-DNA test. Il risultato è stato negativo in 20 pazienti e positivo nelle rimanenti 26. Il gruppo di pazienti nelle quali l'HPV-DNA non è stato rilevato è costituito da 12 ASC-US, 6 L-SIL e 2 H-SIL; 4 di queste pazienti hanno comunque effettuato terapia escissionale, che in tutti i casi si è dimostrata negativa per CIN 2+. Nelle 26 pazienti con esito positivo del test HPV-DNA, il corrispettivo citologico è stato ASC-US in 17 casi, L-SIL in 8, H-SIL in 1 caso; le escissioni sono state 22 e l'esame anatomo-patologico ha dimostrato 5 casi di CIN2+. I risultati ottenuti sono riassunti nelle tabelle sottostanti. I Veri Positivi sono stati 5, i Veri Negativi 4, i Falsi Positivi ben 17, mentre, analogamente a quanto dimostrato in sede di follow-up, non vi sono stati Falsi Negativi. Nell'ambito del triage della patologia cervicale, nella nostra casistica, l'HPV-DNA test ha quindi dimostrato una Sensibilità ed un Valore Predittivo del test Negativo del 100% (SE 0) a fronte di bassi Specificità (19,05%, SE 8,57%) e Valore Predittivo del test Positivo (22,73%, SE 8,93%), indipendentemente dall'età della donna

<u>HPV-DNA TEST NEGATIVO: 20 CASI</u>			
	N. pazienti	Proc. escissionali	CIN2+
ASC-US	12	1	0
L-SIL	6	1	0
H-SIL	2	2	0

Tabella 6. HPV-DNA test di triage negativo.

<u>HPV-DNA TEST POSITIVO: 26 CASI</u>			
	N. pazienti	Proc. escissionali	CIN2+
ASC-US	17	14	3
L-SIL	8	7	1
H-SIL	1	1	1

Tabella 7. HPV-DNA test di triage positivo.

4. DISCUSSIONE

Come già illustrato, la curva di incidenza delle infezioni da HPV presenta il suo picco in concomitanza con l'inizio dell'attività sessuale. Il picco di incidenza delle lesioni precancerose viene registrato, invece, dopo circa 10 anni, mentre il carcinoma della cervice segue di circa altri 10 anni la comparsa delle lesioni precancerose. Diretta conseguenza della frequente insorgenza in giovane età delle lesioni precancerose è la necessità di dover effettuare il trattamento necessario avendo ben presente di dover preservare la fertilità della donna. Il ricorso ad ampie escissioni ed alla conizzazione consente il fertility sparing ma impone la necessità di uno stretto follow-up negli anni successivi. Come riportato da Cubie, le pazienti sottoposte a conizzazione hanno un maggior rischio di ricorrenza per almeno 20 anni dopo la terapia escissionale [30].

È anche dimostrato che le procedure escissionali sono gravate da un certo tasso di fallimento che, in una meta-analisi di 28 studi, varia tra il 7,1 e l'11,3% [30]. Precedenti lavori hanno inoltre dimostrato che il 10-25% delle pazienti sottoposte a conizzazione presenta CIN recidivanti o, addirittura, forme di cancro invasivo, nonostante uno stretto follow-up citologico [37,38]. Ciò significa che la metodica di follow-up basata sulla sola colpo-citologia potrebbe non essere sufficiente a prevenire tutti i casi di cancro della cervice nelle donne sottoposte a trattamento per displasia cervicale grave o moderata [39].

È ormai ampiamente accettato che la scomparsa dell'infezione da HPV dopo il trattamento è associata a bassissimo rischio di recidiva, mentre la persistenza dello stesso è predittiva di rischio aumentato [40-44].

Sulla scorta di tali considerazioni, le Linee Guida Regionali del 2012 [29] ed il documento GISCi "Utilizzo del test HPV-HR nel triage delle ASC-US, delle L-SIL in

donne con più di 35 anni, nel follow-up di donne con citologia ASC-US+ dopo un approfondimento di secondo livello negativo per CIN2+ e nel follow-up dopo trattamento delle lesioni CIN2-3: aggiornamento 2012” [45] hanno rimarcato la raccomandazione di integrare il percorso di follow-up con l'esecuzione del test HPV-DNA.

Le pazienti in follow-up sono una popolazione a maggior rischio, ma non tutte queste pazienti hanno realmente un rischio aumentato di sviluppare una recidiva o di avere una progressione di malattia. Diventa, così, importante poter individuare le pazienti realmente a rischio, per aiutare il medico nel loro management e per risparmiare a tutte le altre una serie di interminabili e inutili controlli.

Il test HPV-DNA è dotato di una Sensibilità e di un Valore Predittivo Negativo estremamente elevati, prossimi al 100%, per cui potrebbe rivelarsi fondamentale negli algoritmi di follow-up post-trattamento.

Uno studio di Kocken ha dimostrato, in un follow-up di 10 anni, che la probabilità di CIN 3 in pazienti con HPV-DNA test negativo a 6 mesi dal trattamento per displasia moderata-grave è del 2,1%. In caso di concomitante citologia negativa, tale percentuale si riduce addirittura all'1,4%. Al contrario, in caso di test positivo a 6 mesi dal trattamento, il rischio di CIN 3, in un arco temporale di 10 anni, è del 29% [45].

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'accuratezza diagnostica dell'HPV-DNA test nel follow-up post-trattamento della displasia cervicale di grado moderato e severo.

Dai nostri dati emerge che il test è dotato di una Sensibilità del 100%, per cui, nella nostra popolazione, non si è verificato nessun caso di recidiva o persistenza di malattia CIN2+ con HPV-DNA negativo. D'altra parte, anche il Valore Predittivo del test

Negativo, nella nostra popolazione, si è dimostrato essere del 100%, per cui quando il test è risultato negativo, non è mai stata riscontrata malattia CIN 2+.

Un dato, a nostro avviso importante, che abbiamo voluto valutare in tutti i casi di HPV-DNA test a 6 mesi negativo, è stato il corrispondente follow-up a 12 mesi dal test virale negativo. Tutte le pazienti risultate negative al test HPV-DNA a 6 mesi, sono risultate negative al controllo a 18 mesi (12 mesi dal test negativo). In altre parole, nessuna delle pazienti negative al test virale effettuato a 6 mesi dal trattamento ha sviluppato una recidiva nei 12 mesi successivi.

Questo rilievo è sostanzialmente in accordo con quanto riportato dall'aggiornamento 2012 del documento GISCi citato in precedenza che, per il follow-up delle pazienti trattate per CIN 2+, riporta: “primo controllo a sei mesi con test per la ricerca di papillomavirus ad alto rischio (HPV-hr). Casi HPV negativi : controllo a 12 mesi con test HPV-hr e colposcopia. Nel caso di entrambi gli esami negativi invio ai normali intervalli di screening”.

In altre parole, l'acquisizione di maggiore fiducia nel significato di un test HPV-DNA negativo, che dovrebbe escludere al 100% la presenza di una lesione displastica cervicale di grado moderato o severo, potrebbe già da subito consentire un dilazionamento dei controlli citologici e colposcopici e, di conseguenza, la riduzione di procedure biotiche o escissionali di fatto prive di utilità clinica. Nel breve-medio termine, inoltre, tale acquisizione potrebbe comportare una ulteriore riduzione del periodo di follow-up delle pazienti HPV negative, riducendo l'intervallo da 24 a 18 mesi. Al contrario, considerata l'elevata probabilità di recidiva in caso di infezione persistente al follow-up, nei casi HPV-DNA positivi potrebbe essere auspicabile una rimodulazione del periodo di osservazione.

La totale assenza di falsi negativi dell'HPV-DNA test fa sì che esso possa essere proficuamente impiegato durante il follow-up per ridurre il numero di controlli e per individuare le sole pazienti da indirizzare a citologia e colposcopia. La conseguente riduzione di inutili procedure diagnostico-terapeutiche comporterebbe la diminuzione dei costi ad esse associati, consentendo quindi un notevole risparmio di risorse economiche ed umane al SSN.

Collateralmente segnaliamo che, nella nostra casistica, in accordo con quanto emerge nelle linee guida nazionali ed internazionali, il test HPV “di triage”, effettuato presso il Nostro Servizio, nelle alterazioni citologiche di basso grado (ASC-US e L-SIL) ha dimostrato un Valore Predittivo del test Negativo del 100%.

5. CONCLUSIONI

Con questo studio abbiamo voluto indagare la performance dell'HPV-DNA test nel follow-up della displasia cervicale moderata e grave. Il nostro lavoro, in linea con quanto riportato in letteratura, ha dimostrato che il test HPV-DNA è dotato oltre che di elevata Sensibilità anche di un elevato Valore Predittivo Negativo. In altre parole, un test negativo consentirebbe di escludere, nella pressoché totalità dei casi, lesioni istologiche CIN2+. I nostri dati suffragano tale proprietà anche nel triage delle anomalie colpo-citologiche, a riprova della scarsissima probabilità che si instaurino processi displastici cervicali in assenza di infezione virale.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893–2917
2. AIRT working group. I tumori in Italia - Rapporto 2006. Incidenza, mortalità e stime. *Epidemiologia e prevenzione* 2006;1:64-5
3. World Health Organization. Preparing for the introduction of HPV vaccines. Policy and programme guidance for countries. UNFPA & World Health Organization, Geneva. 2006
4. Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, et al; International Agency for Research on Cancer (IARC) 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;98:303-15
5. Tristram, A., & Fiander, A. Human papillomavirus (including vaccines). *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* 2007;17(11):324-329
6. Schiffman M, Castle PE. The promise of global cervical-cancer prevention. *N Engl J Med* 2005;353:2101-4
7. Frazer IH, Cox JT, Mayeaux EJ Jr, et al. Advances in prevention of cervical cancer and other human papillomavirus-related diseases. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:S65-81
8. P Tilston, Anal Human Papillomavirus and anal cancer, *J Clin Pathol* 1997; 50:625-634
9. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer : a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010;11:1048-1056

10. Munoz N, Bosch F, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of HPV types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-527
11. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, et al. Epidemiology and natural history of human papilloma virus infections and type specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008;26:K1-K16
12. La Placa, *Principi di microbiologia medica* 9ed. Società Editrice Esculapio, 2002
13. R.S. Cotran, V. Kumar, T: Collins, T. Robbins *Le basi patologiche delle malattie*, 6 ed Piccin 2000
14. G. Dell, K. Gaston. Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1923-42
15. Munger K, Phelps, WC, Bubb V, et al. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*. 1989;63:4417-4421
16. Havre P, Yuan J, Hedrick L, et al. P53 inactivation by HPV 16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res*. 1995;55:4420-4424
17. Demers G, Foster S, Halbert C, et al. Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:4382-3486
18. P.L. Stern, M. Brown et al Natural HPV immunity and vaccination strategies. *J Clin Virol* 2000;19:57-66
19. M . Stanley, Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S16-22

20. A. Agarossi, E. Casolati, Human papillomavirus and human immunodeficiency virus (HIV). *J Gynecol Obstet*, 2006,18(1):32-36
21. Frazer IH, Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 2004 Jan;4(1):46-54
22. F. Boselli *Colposcopia e fisiopatologia del tratto genitale inferiore*. Testo Atlante Mediacom
23. DR Lowry, J.T.Schiller Prophylactic human papillomavirus Vaccines, *J Clin Invest* 2006 May 1;116(5):1167–1173
24. M. Blackwell, Human papilloma virus infection *American Journal of Transplantation* 2004;4(Suppl. 10):95–100
25. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol.* 2006;208:152–164.
26. J. Dillner Primary screening for human papilloma virus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2001;15:743-57
27. Pagliusi S.R., Aguado M.T., Efficacy and others milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine* 2006;23:569-578
28. Arbyn M, Ronco G, Antila A et al. Evidence regarding human papilloma virus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* 2012;30(Suppl. 5):F88-99
29. Protocollo diagnostico terapeutico dello screening per la prevenzione dei tumori del collo dell'utero nella regione Emilia-Romagna (4^edizione- anno 2012)
30. Cubie H.A, Cuschieri K. Understanding HPV test and their appropriate applications. *Cytopathology* 2013;24(5):289-308

31. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, Wiener HG, Herbert A, Daniel J, Von Karsa L. European Guidelines for quality assurance in cervical cancer screening – second edition 2008
32. Ronco G et al., The new technologies for cervical cancer screening randomized controller trial. An overview of results during the first phase of recruitment. *Gynecol oncol* 2007;107(1 suppl):230-2
33. Protocollo diagnostico-terapeutico dello screening per la prevenzione dei tumori del collo dell'utero nella Regione Emilia-Romagna, 3^a edizione , Anno 2008
34. Lui R. Clinical Utility of HPV testing. *Clin Obstet Gynecol* 2013;56(1):17-24
35. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of Cervical Cytology. *JAMA* 2002;287: 2114-19
36. Linee Guida per la gestione della paziente con PAP-test anormale. A cura della SICPCV. *La colposcopia in Italia Anno XIX – n.1- Dicembre 2006*
37. Cox JT, Lornizc AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen, Kurmar RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undeterminate significance. *J Obstet Gynecol* 1995;172:946-54
38. Patterson BS, Chappatte OA, Clark SK. The significance of cone biopsy resection margins. *Gynecol Oncol* 1992;46:182-5
39. Smita Jain BS, Chih-Jen Tseng, Shang-Gwo Horng, Yung-Kuei, Chia C Pao. Negative predictive value of human papillomavirus test following conization of the cervix uteri. *Gynecol Oncol* 2001;82:177-180
40. Solomon D. Chapter 14: Role of triage testing in cervical cancer screening. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:97-101

41. Costa S, De Simone P, Venturoli S, et al. Factors predicting Human papillomavirus clearance in cervical intraepithelial neoplasia lesions treated by conization. *Gynecol Oncol* 2003;90:358-65
42. Cecchini S, Carozzi F, Confortini M, et al. Persistent human papilloma virus infection as an indicator of risk of recurrence of high-grade cervical intraepithelial neoplasia treated by the loop electrosurgical excision procedure. *Tumori* 2004;90(2):225-8
43. Arbyn M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN. An update of pooled evidence. *Gynecol Oncol* 2005;99(suppl 3):7-11
44. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine* 2006;24(suppl 3):78-89
45. Documento GISCI “Utilizzo del test HPV-HR nel triage delle ASC-US, delle L-SIL in donne con più di 35 anni, nel follow-up di donne con citologia ASC-US+ dopo un approfondimento di secondo livello negativo per CIN2+ e nel follow-up dopo trattamento delle lesioni CIN2-3: aggiornamento 2012”
46. Kocken M, Helmerhorst TJ, Berkhof J et al. Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long term multi-cohort study. *Lancet Oncol* 2011;12:441-50