



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Dottorato di ricerca XXXIV ciclo

Scienze della Salute

Curriculum "Epidemiologia e Prevenzione Vaccinale"

*Tipizzazione morfo-molecolare nelle lesioni preneoplastiche  
della cervice uterina*

Relatore: Prof. Giancarlo Icardi

Correlatori: Prof. Valerio Vellone

Prof. Andrea Orsi

Candidata: Varesano Serena

## Sommario

ABSTRACT .....	4
Capitolo 1 - LE INFEZIONI DA PAPILOMAVIRUS UMANO (HPV) .....	6
Il virus HPV.....	6
Organizzazione della struttura virale.....	8
L'infezione .....	9
Stato fisico del genoma virale.....	11
Stadi dell'infezione .....	12
Meccanismo d'azione di E6 e E7 .....	14
Biomarcatori dell'infezione da HPV .....	15
Capitolo 2 - CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA .....	17
Epidemiologia.....	17
Le lesioni preneoplastiche e neoplastiche cervicali.....	18
Classificazione delle lesioni cervicali.....	19
Cofattori coinvolti nella carcinogenesi .....	22
Fattori di rischio e fattori preventivi.....	22
Capitolo 3 - SCREENING DEL CARCINOMA CERVICALE E DIAGNOSI DELLE INFEZIONI DA HPV .....	24
Strategie di prevenzione secondaria – Lo screening .....	24
Il Pap test.....	25
HPV DNA test.....	29
Colposcopia e biopsia cervicale .....	30
Conizzazione .....	33
Capitolo 4 - PROFILASSI CONTRO L'HPV .....	36
Strategie di prevenzione primaria: il vaccino anti-HPV.....	36
Strategia vaccinale in Italia .....	38
Efficacia dei vaccini profilattici anti-HPV .....	38

Capitolo 5 - IL PROTOCOLLO DI SCREENING .....	40
OBIETTIVO .....	42
MATERIALI E METODI .....	43
Scelta dei campioni.....	43
Flusso di lavoro .....	45
Immunoistochimica: cenni tecnici.....	46
IHC: Protocolli utilizzati.....	50
Estrazione del DNA: cenni tecnici.....	52
Real time: cenni tecnici .....	55
Analisi molecolare: cenni tecnici .....	58
RISULTATI .....	62
Coinfezioni, genotipi e carica virale.....	66
Istologia VS test molecolare .....	67
CONCLUSIONE .....	68
OBIETTIVI FUTURI .....	69
BIBLIOGRAFIA .....	70

## *ABSTRACT*

### *Background*

Le lesioni neoplastiche e preneoplastiche della cervice uterina rappresentano un rilevante problema socio-sanitario, ancora troppe donne giungono all'osservazione con lesioni avanzate che richiedono trattamenti invasivi. L'analisi morfologica ha scarsa sensibilità e variabilità. Solo l'integrazione con dati molecolari consentirebbe una maggiore robustezza diagnostica, una personalizzazione del trattamento farmacologico e di follow up.

### *Scopo*

L'obiettivo di questo studio è quello di migliorare la caratterizzazione delle lesioni al secondo livello attraverso analisi non morfologiche.

L'infezione persistente è necessaria, ma non sufficiente per indurre la trasformazione neoplastica. Occorre la presenza di cofattori capaci di influenzare l'andamento della lesione, come: *il genotipo, la carica virale, la presenza di coinfezioni e lo status di integrazione* del genoma di HPV in quello della cellula ospite. Tuttavia, i soli esami di screening di primo livello non sono in grado di determinarli in quanto basati sulla morfologia. *Si propone l'uso di un test molecolare* in grado di rilevare i cofattori in modo da migliorare la diagnostica al secondo livello, caratterizzare la lesione capendone il reale rischio di progressione. Ciò consentirebbe di trattare in modo mirato *solo* le donne con lesioni ad alto rischio di progressione.

### *Materiali e metodi*

L'analisi dei campioni cervicali è eseguita su materiale FFPE, soprattutto di biopsie e curettage.

I campioni sono stati analizzati in doppio: sia in immunohistochimica per valutare l'espressione di p16 e Ki67; sia dal punto di vista molecolare tramite piattaforma multiplex Real time per la determinazione di carica virale, genotipo e coinfezioni

### *Risultati*

Dall'analisi istologica è emerso che i 55 campioni analizzati sono 22/55 casi CIN1 e di questi l'analisi molecolare evidenzia 12/22 casi negativi, ovvero il 54% dei CIN1 in realtà non sono lesioni HPV-related. Inoltre, 10 casi di CIN1 sono coinfezzati e con cariche virali alte, ovvero sono a maggior rischio di progressione neoplastica e andrebbero strettamente monitorati nel tempo.

### *Discussione*

Lo studio conferma che con la sola analisi morfologica si tende a sovrastimare le CIN1, con ripercussioni soprattutto per le pazienti, che vanno incontro ad ulteriori accertamenti diagnostici, anche di tipo invasivo, quando, invece, non sarebbero da trattare.

Inoltre, è stato possibile rilevare lesioni di basso grado caratterizzate da coinfezioni, con ceppi ad alto rischio e carica alta, rendendole ad alto rischio di progressione. Questi casi andrebbero monitorati nel tempo.

### *Conclusione*

L'analisi molecolare può migliorare la diagnosi e consente un protocollo terapeutico personalizzato. Inoltre, *occorre affinare le procedure diagnostiche nel secondo livello* in modo da inviare a conizzazione solo le pazienti che ne hanno reale bisogno

L'esperienza acquisita verrà estesa ad altri distretti anatomici colpiti da patologia HPV-relata.

## *Capitolo 1 - LE INFEZIONI DA PAPILOMAVIRUS UMANO (HPV)*

### *Il virus HPV*

I Papillomavirus appartengono alla famiglia dei *Papillomaviridae* e quelli capaci di infettare l'uomo vengono chiamati **Papillomavirus umani (HPV)**. Sono virus a DNA, caratterizzati da un genoma circolare a doppio filamento, dalla assenza di envelope e da un capsido a simmetria icosaedrica.

Il virus HPV ha uno spiccato tropismo per le cellule della cute e dei rivestimenti delle cavità interne corporee ed è capace di procurare lesioni sia benigne che maligne.

Tra le più frequenti manifestazioni troviamo quelle a carico della cute, per la maggior parte dei casi di natura benigna, come le *verruche*; mentre quelle a carico delle mucose del tratto genitale colpiscono le cellule basali dell'epitelio squamoso pluristratificato e quelle della *giunzione squamo-colonnare (GSC)* del collo dell'utero.<sup>1</sup>

Il virus HPV causa di una delle più frequenti infezioni sessualmente trasmesse. Il picco massimo d'incidenza si ha in giovane età, subito dopo l'inizio dell'attiva sessuale, per poi ridursi col crescere dell'età.<sup>1</sup>

Nel 1975 il virologo tedesco Harald zur Hausen comunicò l'evidenza che il virus HPV poteva provocare il carcinoma della cervice uterina. Fu proprio grazie a lui che si arrivò al 1999 in cui venne affermata la presenza del virus nel 99,7% dei casi di carcinoma, confermando la sua iniziale intuizione. Oggi l'associazione del virus HPV con lesioni displastiche preneoplastiche, o anche carcinomi invasivi, è ormai certa.<sup>2,3</sup>

Studi sia molecolari che epidemiologici hanno messo in evidenza che esistono alcuni ceppi di HPV maggiormente implicati nella formazione di lesioni cervicali CIN (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*). L'analisi del DNA virale ha identificato più di 200 ceppi di HPV che, successivamente, sono stati classificati in base alla loro capacità oncogenica.<sup>4</sup>

La classificazione filogenetica ed epidemiologica li suddivide in tipi a **basso rischio (LR-HPV)**, riscontrabili soprattutto nei condilomi genitali, e tipi ad **alto rischio (HR-HPV)**, frequentemente associati con il cancro cervicale invasivo.<sup>5</sup>

Nel 2012 lo IARC (International Agency for Research on Cancer) ha classificato gli HPV sulla base della loro capacità trasformante, ovvero sulla loro capacità di causare la trasformazione neoplastica.<sup>6</sup> In base a questa classificazione, gli HPV sono divisi nelle quattro categorie riportate in Figura 1.

	Genotipi HPV	Classificazione IARC	Motivazioni
Alto rischio	HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	GRUPPO 1 (Agente carcinogeno per l'uomo)	Riconosciuti agenti capaci di causare un cervico-carcinoma
Probabile Alto rischio	HPV 68	GRUPPO 2A (Agente probabile carcinogeno per l'uomo)	Esistono pochi dati epidemiologici ma è provata la sua oncogenicità
Possibile Alto rischio	HPV 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82	GRUPPO 2B (Possibile Agente carcinogeno per l'uomo)	Possibili oncogeni, in quanto le evidenze sono ancora limitate
Basso rischio o non carcinogeni	HPV 6, 11	GRUPPO 3 (Agenti non classificabili come carcinogeni)	Non vi è alcuna evidenza che di associazione al cancro

Fig. 1 - Classificazione dei tipi di HPV secondo il grado di oncogenicità (IARC, 2012)

I ceppi più frequentemente associati a lesioni cervicali sono HPV16 e HPV18.

In particolare, HPV16, da solo, è la causa di oltre il 50% delle neoplasie cervicali; mentre HPV18 di circa il 20%. L'HPV16 è il ceppo più comune, seguito dall'HPV18, presente nel 14,1% di tutti i casi.

Inoltre, la prevalenza dell'HPV16 sembra essere stabile nelle diverse aree geografiche, mentre quella degli altri genotipi appare eterogenea tra le varie popolazioni. Ad esempio, i tipi HPV35 e HPV45 mostrano una prevalenza maggiore in Africa, mentre invece, i tipi HPV33 e HPV58 sono predominanti in Cina e in altri paesi dell'Asia centrale. Complessivamente, i tipi HPV16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, e 35 sono responsabili del 95% dei casi di carcinoma cervicale.<sup>7</sup>

## Organizzazione della struttura virale

Capside. HPV presenta un capsidico a simmetria icosaedrica. È costituito da 72 capsomeri (12 pentameri e 60 esameri) ed è formato da 2 *proteine strutturali*: la proteina capsidica maggiore (**L1**), costituente l'80% delle proteine virali totali, e la proteina virale minore (**L2**).

L1 è coinvolta principalmente nel legame al DNA virale; mentre la proteina L2, svolge un ruolo di tipo strutturale.<sup>8</sup>

Genoma. Il genoma virale è costituito da una singola molecola di DNA circolare, di circa 7900 paia di basi (Fig. 2); l'organizzazione del genoma di HPV in forma lineare viene mostrata in Figura 3.

Il genoma presenta tre regioni principali:

- **Regione precoce E (Early)**: geni (E1-E7) codificanti proteine *regolatrici*, coinvolte nei processi di trascrizione, replicazione, trasformazione virale, tra cui le *oncoproteine E6 e E7*;
- **Regione tardiva L (Late)**: geni (L1-L2) codificanti proteine *strutturali*, come quelle del capsidico;
- **Regione di controllo (LCR)**: geni di controllo per la trascrizione e la replicazione.

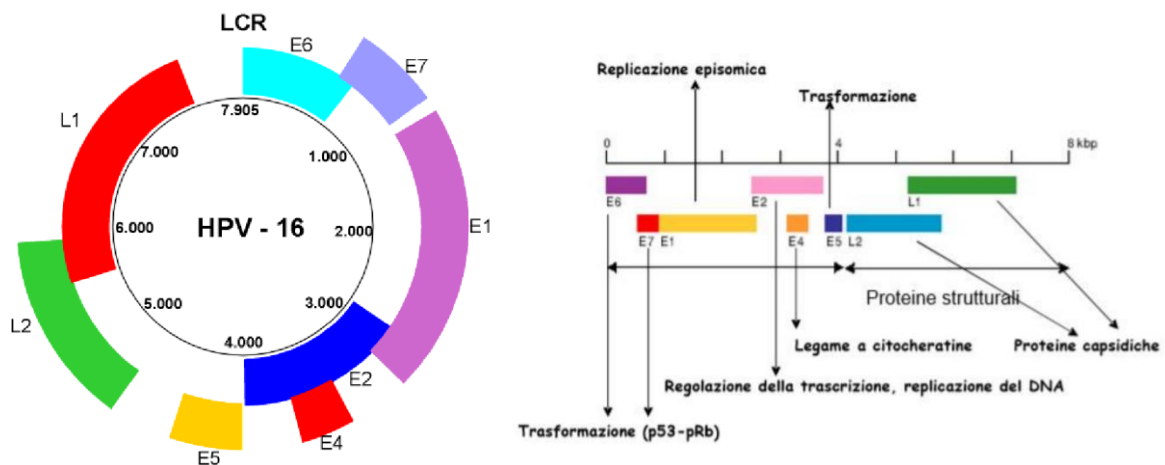


Fig. 2 – Rappresentazione schematica del genoma virale di HPV, in forma circolare (sinistra) e lineare (destra)

I *geni precoci* vengono trascritti nelle *fasi non produttive* delle infezioni e codificano per proteine funzionali necessarie alla replicazione del DNA e, in alcuni casi, importanti nella trasformazione cellulare. I *geni tardivi*, invece, sono espressi soprattutto nelle *fasi produttive* delle infezioni.

Sebbene il genoma di HPV sia una molecola di dimensioni ridotte, la sovrapposizione dei geni e lo splicing alternativo, consentono la codificazione di numerose proteine.<sup>9</sup>



## L'infezione

Il ciclo replicativo di HPV è strettamente legato allo stato di differenziazione delle cellule infettate.

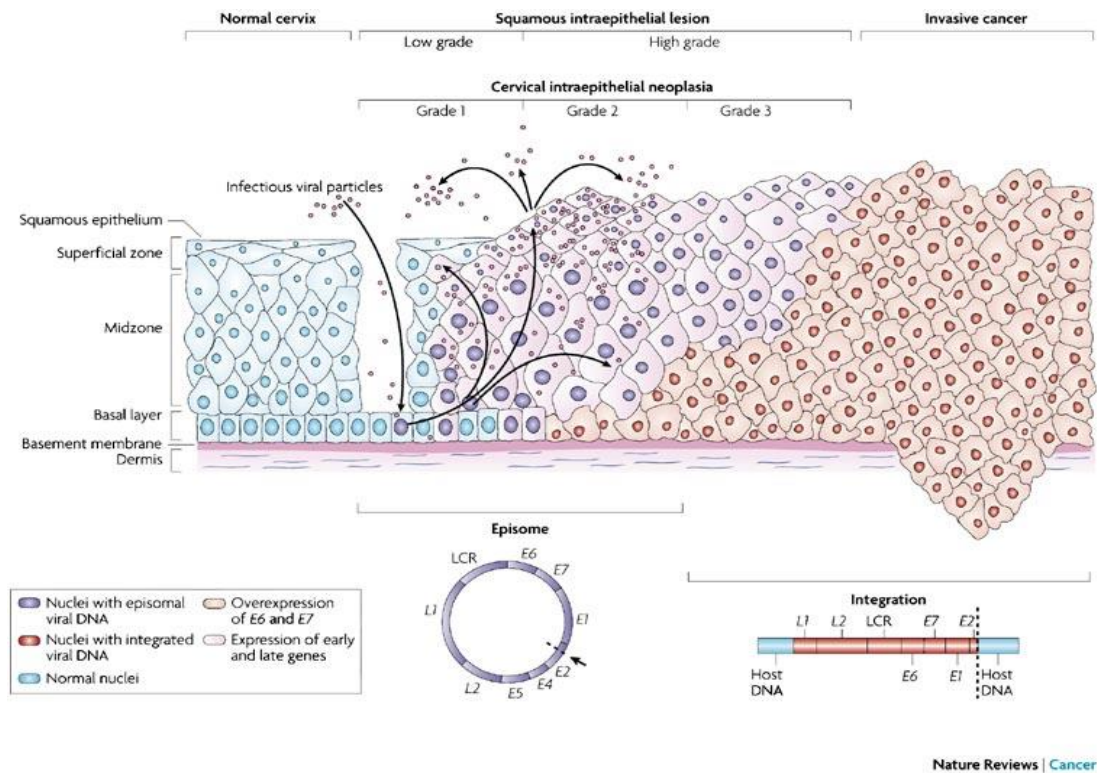


Fig. 3 – Rappresentazione schematica degli stati di infezione virale di HPV

L'infezione da HPV avviene nel momento in cui il virus è in grado di raggiungere le cellule dello strato epiteliale basale, che presentano proprietà simili a quelle delle cellule staminali (Fig. 3).

La zona anatomica di maggiore fragilità è la **giunzione squamo-colonnare (GSC)**, situata tra l'epitelio squamoso (o pavimentoso), che riveste la cervice e la vagina, e l'epitelio colonnare (o cilindrico), che riveste il canale cervicale (Fig.4) <sup>4</sup>.

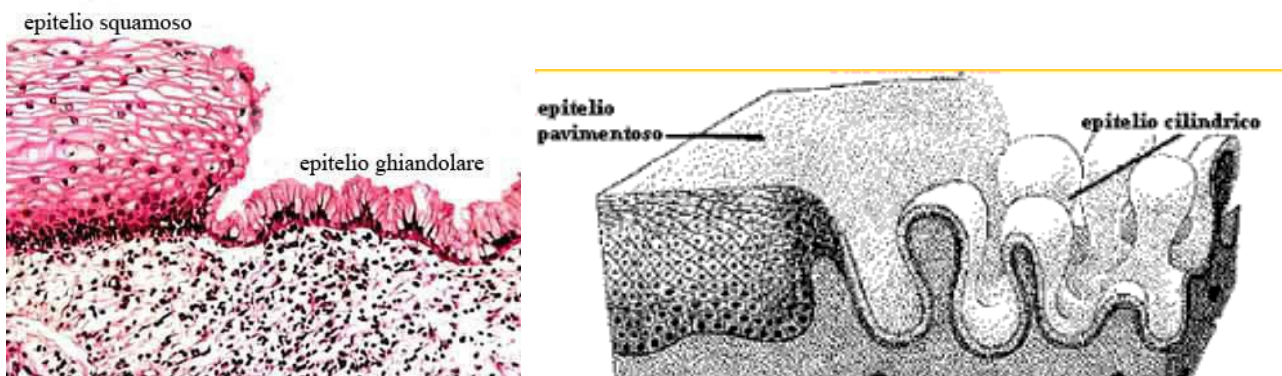


Fig. 4 – Rappresentazione della giunzione squamo-colonnare (GSC)

Una volta raggiunta la cellula target, il processo riproduttivo della progenie virale *evolve in parallelo* al processo di maturazione della cellula stessa e si completa con l'assemblaggio della particella virale negli strati sopra basali.<sup>10</sup>

Le proteine virali sono necessarie per l'adesione alle cellule degli epiteli e delle mucose, per la penetrazione al loro interno e per la diffusione alle cellule vicine.

La proteina L1, essendo il principale costituente del capsido virale, diventa il bersaglio principale delle difese dell'organismo quando avviene l'infezione e da cui si innescano la produzione di anticorpi neutralizzanti e dell'immunità cellulo-mediata specifica contro HPV.

I meccanismi biologici alla base dell'intero processo prevedono l'interazione tra fattori virali e fattori cellulari. In particolare, *la proteina E6 altera la crescita cellulare legandosi alla proteina p53*, portando ad una diminuzione della sua attività dentro le cellule.<sup>11</sup>

Queste interazioni, quindi, hanno come effetto principale *l'instabilità cromosomica e l'alterazione dei meccanismi cellulari di controllo della crescita*. L'inibizione di questi meccanismi di controllo porta al processo di *trasformazione cellulare*.<sup>12</sup>

Nel caso in cui non vi sia una reazione immunitaria efficace si possono generare delle lesioni benigne e/o maligne.

- Le lesioni benigne indotte dall'HPV includono le *verruche cutanee* non genitali e ano genitali, i *papillomi* del cavo orale e laringei, e i *condilomi* mucosi ano-genitali;
- I tumori maligni che possono evolvere da infezioni persistenti da HPV possono includere, oltre al carcinoma della cervice uterina, il carcinoma anale, il cancro del pene, della vulva e della vagina, oltre ad alcuni carcinomi del cavo orale.<sup>13</sup>

È importante specificare che l'infezione di ceppi di HPV ad alto rischio a livello della cervice uterina può essere *transitoria* e regredire spontaneamente, oppure essere *persistente* e portare a sviluppare lesioni di grado più avanzato (Fig. 5).<sup>14</sup>

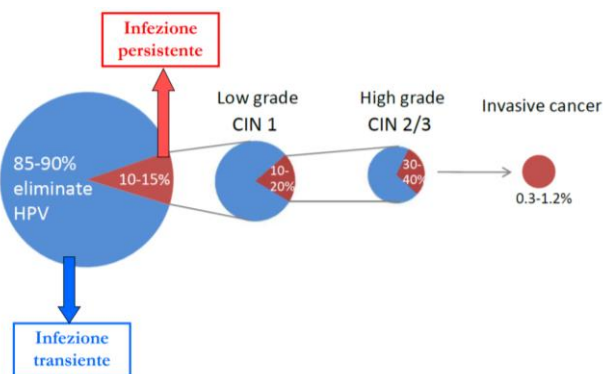


Fig. 5 – La percentuale delle infezioni persistenti sono una minoranza rispetto a quelle che regrediscono spontaneamente. L'evoluzione della lesione è progressiva, ovvero passa da uno stadio a basso grado (CIN1) ad uno ad alto grado (CIN2/3) per poi eventualmente evolvere in carcinoma invasivo.

### Stato fisico del genoma virale

All'interno della cellula infettata, il DNA virale può trovarsi in forma circolare extracromosomica, come un plasmide, chiamata **episoma**, o essere **integrato** nel genoma della cellula ospite e l'integrazione prevede che il DNA si linearizzi (Fig. 3).

Una volta avvenuta l'interazione HPV-cellula, si possono manifestare quadri infettivi diversi, ovvero:

- Infezione precoce, non produttiva;
- Infezione tardiva, produttiva;
- Integrazione del DNA virale in quello cellulare.

Nella fase iniziale dell'infezione, quando il virus colonizza le cellule basali dell'epitelio, la replicazione è precoce, non produttiva, il genoma virale si replica in forma episomale e si manifesta uno stato di *infezione latente*. Il significato dell'infezione latente è poco conosciuto. Non è noto per quanto tempo l'HPV possa mantenere tale stato o in quale percentuale di casi l'infezione latente possa progredire in infezione produttiva.<sup>4</sup>

Il passaggio dallo stato di latenza episomale a quello produttivo avviene quando il DNA di HPV diventa lineare e si integra in quello della cellula ospite, a cui fa seguito la produzione delle proteine precoci. In queste condizioni il virus si moltiplica come entità autonoma, mentre l'attività del DNA cellulare viene inibita.

L'evento dell'integrazione spezza il genoma di HPV a livello della regione E1/E2, mentre mantiene integra la regione E6/E7. Le proteine E6 ed E7, infatti, hanno un ruolo chiave per il processo infettivo.<sup>4</sup>

### *Stadi dell'infezione*

L'infezione virale inizia con il legame di HPV sulla superficie della cellula bersaglio dello strato epiteliale basale, come conseguenza di piccole ferite o traumi locali.

Il ciclo replicativo virale, come detto, ha una fase iniziale non produttiva in cui il genoma virale si stabilizza nella cellula ospite in forma episomale, uno stato che viene mantenuto stabilmente replicandosi in sincronia con il DNA cellulare.

Durante la *fase iniziale* del ciclo replicativo di HPV l'espressione dei geni virali è limitata ai geni precoci, in particolare a E6, E7, che stimolano la cellula infettata a proliferare.

Successivamente, un gruppo di cellule figlie abbandona la membrana basale per andare ad espandersi verso gli strati superiori dell'epidermide, diffondendo il virus. A questo punto inizia la *fase tardiva*, in assenza di replicazione del DNA virale, con l'espressione di geni virali tardivi e la traduzione di proteine strutturali. Successivamente, nelle cellule differenziate, viene completamente perso il controllo del numero di copie genomiche e il DNA è amplificato fino ad avere migliaia di copie per cellula. Infine, negli strati superiori dell'epitelio, si verifica l'assemblaggio e il rilascio nell'ambiente extracellulare di particelle virali mature.<sup>15</sup>

Durante l'infezione da HPV, le proteine oncogene E6 e E7 hanno un ruolo importante: agiscono sui check point del ciclo cellulare legandosi a proteine regolatorie specifiche.<sup>16, 17</sup>

In particolare, è ben caratterizzata l'associazione di E7 con la proteina **retinoblastoma (pRb)**. pRb è un regolatore negativo del ciclo cellulare e normalmente previene l'ingresso in fase S associandosi al fattore di trascrizione *E2F*. In questo caso, invece, E7 si lega a pRb spiazzando E2F e comincia l'espressione delle proteine necessarie alla replicazione del DNA.<sup>18</sup>

L'azione di E6 si associa a quella di E7, prevenendo l'apoptosi in risposta all'ingresso in fase S mediato da E7. Inoltre, E6 si associa a **p53**, determinandone l'ubiquitinazione e la conseguente degradazione inattivando il suo effetto soppressivo verso la crescita e/o dell'apoptosi. La presenza di E6, quindi, è considerata un fattore predisponente lo sviluppo di un carcinoma associato ad HPV, poiché permette l'accumulo di errori casuali nel DNA della cellula ospite che non vengono riconosciuti (Fig. 6).<sup>17</sup>

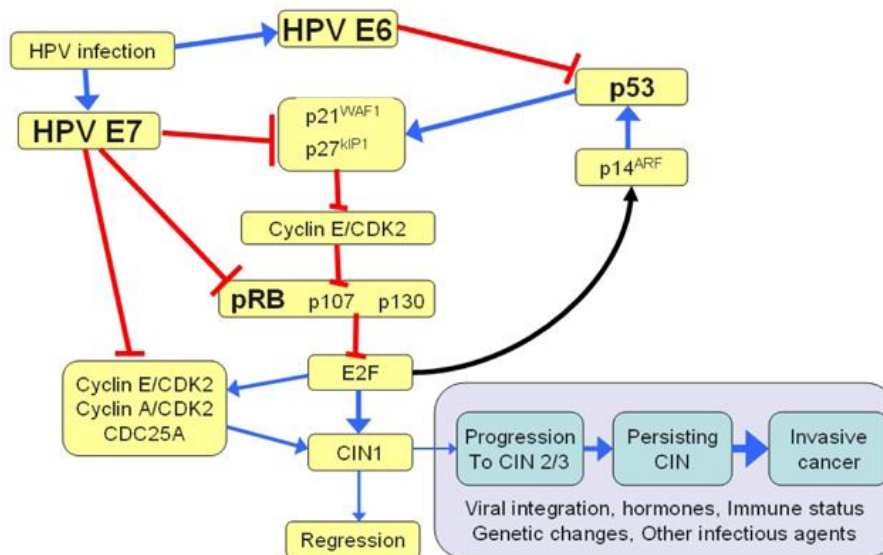


Fig. 6 – Schema delle interazioni tra proteine E6/E7 con p53 e pRB

La patogenesi derivante dall'infezione di HPV è diversa a seconda del tipo di infezione che si realizza. Il ciclo replicativo completo del virus, con produzione di una progenie virale matura, è tipico delle infezioni da HPV a basso o medio rischio o delle lesioni di basso grado degli HPV ad alto rischio, in cui il genoma degli HPV permane in forma episomale. Invece, nelle lesioni ad alto grado indotte dall'infezione da HPV ad alto rischio avviene l'integrazione del DNA virale nel DNA cellulare, con conseguente mancata produzione di una progenie virale completa, ma determina l'immortalizzazione della cellula infettata. Il fenomeno dell'integrazione, quindi, è indispensabile nei meccanismi di immortalizzazione cellulare e della successiva trasformazione neoplastica. L'integrazione, infatti, comporta la rottura della regione genomica tra E1/E2 e, di conseguenza, si ha la perdita dell'azione repressiva di E2 sulle oncoproteine virali E6 e E7. 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 il gene E2 viene perso o non trascritto.<sup>19</sup>

## *Meccanismo d'azione di E6 e E7*

Per favorire la progressione tumorale indotta dagli HPV è necessario un processo a più fasi.

Il gene E6 è uno dei primi ad essere espresso durante l'infezione dei Papillomavirus. Codifica per una proteina priva di attività enzimatica intrinseca e che per esercitare la sua funzione deve legarsi a diverse proteine cellulari<sup>20</sup>. Una di queste è p53, il principale oncosoppressore cellulare.

Svolge un ruolo di primaria importanza nel regolare l'espressione di proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare; viene attivata in seguito a danno al DNA e induce l'espressione di p21, un inibitore delle chinasi dipendenti dalle cicline, con conseguente blocco del ciclo cellulare e induzione di apoptosi.<sup>21, 22</sup>

La seconda oncoproteina importante per la patogenesi virale è E7. La caratteristica di E7 riguarda la sua capacità di associarsi a retinoblastoma (Rb). In situazione di normalità, Rb, durante la fase G1 precoce, è ipofosforilata e si associa con i fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia E2F, che, a loro volta, si legano ai promotori di geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare verso la fase S o nei meccanismi apoptotici. Questo ha come conseguenza la repressione della trascrizione. Per rendere possibile la progressione dalla fase G1 a S, i complessi ciclina chinasi fosforilano Rb, con conseguente rilascio di Rb dal complesso con E2F, rendendo possibile la trascrizione di geni coinvolti nella sintesi del DNA.<sup>23</sup>

In caso di infezione da HPV, l'oncoproteina E7 ha la capacità di reclutare Rb con conseguente attivazione costitutiva dei geni bersaglio di E2F. In questa situazione, viene persa la funzione di Rb e dei punti di controllo del ciclo cellulare.

Una delle proprietà più caratteristiche di E7 degli HPV ad elevato rischio è la loro capacità di indurre instabilità genomica. Molti tipi di cancro positivi per HPV contengono aneuploidie, ad indicare che variazioni nel numero di cromosomi sono eventi importanti nella progressione tumorale.<sup>23</sup>

Tutto questo mette in evidenza un punto importante, ovvero che *l'azione associata di E6 e E7 porta ad un'immortalizzazione cellulare più efficiente rispetto a quando le due proteine agiscono separatamente*. Infatti, studi in vivo hanno dimostrato che topi transgenici esprimenti solo E6 o solo E7 sviluppavano al massimo delle lesioni di basso grado con scarsa o nulla probabilità di progressione neoplastica.

## Biomarcatori dell'infezione da HPV

### Valutazione delle lesioni persistenti

Solo alcune donne positive al test HPV sviluppano cancro. Quindi, il riscontro di un singolo test HPV positivo, in assenza di lesioni clinicamente significative, non sembra giustificare l'intervento terapeutico. Dal momento che le infezioni persistenti sono quelle più a rischio di progressione neoplastica, le strategie di screening si basano sulla *ripetizione del test HPV a 6-12 mesi dal primo riscontro positivo*. In questo modo si migliora l'identificazione del gruppo di donne con un rischio reale da inviare all'esame colposcopico, evitando il trattamento di lesioni destinate a regredire.<sup>24</sup>

### Valutazione dello stato di integrazione – la proteina p16

L'integrazione di HPV ad alto rischio nel genoma della cellula infettata è un evento cruciale nella tumorigenesi, in quanto promuove l'espressione dei trascritti dei geni E6/E7.

La valutazione dello stato di integrazione del genoma di HPV può essere rilevata in modo indiretto tramite la valutazione IHC dell'espressione della proteina **p16<sup>INK4a</sup>**.<sup>25</sup>

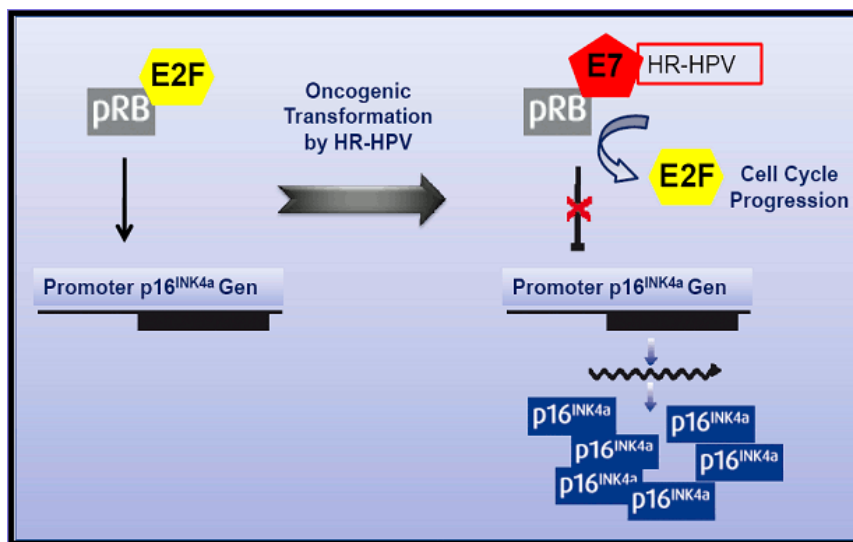


Fig. 7 – Schema delle interazioni tra E7-pRB-E2F ed effetto su p16

Infatti, un fenomeno molto importante del processo di integrazione virale è rappresentato dall'iperproduzione di **p16**, un oncosoppressore che funge da servofreno all'immortalizzazione della cellula. Infatti, la cellula, immortalizzata dall'integrazione virale, cerca di andare in apoptosi iperproducendo p16 (Fig. 7).

Pertanto, come epifenomeno dell'infezione da HPV c'è l'iperproduzione di p16 che si accumula nel citoplasma. L'accumulo di p16 è rilevabile tramite colorazione immunohistochimica.<sup>26</sup>

L'iperespressione della p16 nelle cellule displastiche indica un'attiva espressione dell'oncogene virale E7. L'espressione del gene E7 nelle cellule epiteliali in replicazione comporta la distruzione del complesso pRb-E2F e l'inattivazione funzionale del pRb. Ciò induce una overespressione dell'inibitore chinasi p16 ciclina dipendente in maniera indipendente dal tipo di HPV ad alto rischio. Il gene INK4 è uno dei più frequenti geni oncosoppressori inattivati nel cancro umano. La p16 INK4a (inibitore della chinasi ciclina dipendente) è un gene oncosoppressore in grado di prevenire la fosforilazione della pRb, bloccando così la cellula in fase G1.

Quando l'oncoproteina E7 lega la pRb viene rilasciato il fattore trascrizionale E2F permettendo alla cellula di procedere dalla fase G1 alla fase S della divisione cellulare.<sup>25</sup>

Nelle cellule normali, la p16 INK4a non è determinabile attraverso l'immunoistochimica; al contrario, gli stadi cellulari di displasia e metaplasia sono caratterizzati da differenti espressioni di p16 INK4a rispettivamente "diffuso" e "localizzato". Nelle cellule displastiche ed in proliferazione la p16 INK4a è fortemente espressa e quindi facilmente identificabile con metodi immunoistochimici. Dal momento che l'espressione della p16 INK4a è sottoposta ad un controllo di feedback negativo da parte della pRb funzionante, l'iperespressione rappresenta un utile biomarcatore per cellule in cui vi è un'intensa espressione degli oncogeni HPV.

Pertanto, p16 INK4a rappresenta un importante indicatore indiretto dell'integrazione del genoma di HPV nelle cellule ospiti.<sup>25, 26</sup>

#### *Ricerca dei trascritti oncogenici*

Poiché la maggior parte delle infezioni da HPV è transitoria e solo l'HPV che esprime attivamente le proteine oncogeniche può causare il cancro della cervice, si sono implementate nuove metodiche atte a ricercare i trascritti oncogeni di E6/E7. Il rilevamento degli mRNA E6 e E7 di genotipi oncogeni di HPV potrebbe essere un utile indicatore prognostico della progressione delle lesioni precancerose verso il cancro della cervice di utilizzo futuro.

Il rilevamento dei trascritti oncogeni di E6 ed E7 di genotipi maligni suggerisce che l'espressione di questi trascritti vada di pari passo con la severità delle lesioni cervicali.<sup>27, 28</sup>



## *Capitolo 2 - CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA*

### *Epidemiologia*

Il **carcinoma alla cervice uterina** continua a rappresentare un importante problema sanitario: a livello mondiale, nel 2020, sono stati registrati 604.000 nuovi casi e 342.000 decessi, rappresentando il quarto tumore per incidenza della donna. Inoltre, si stima che circa l'84% dei casi di tumore cervicale si verifichi attualmente nei Paesi in via di sviluppo.<sup>29, 30</sup>

In Italia rappresenta il quinto tumore per frequenza nelle donne sotto i 50 anni di età. Nel 2020, ci sono state circa 2.400 nuove diagnosi (1,3% di tutti i tumori incidenti nelle femmine).

Questa neoplasia è più frequente nella fascia giovanile dai 15 ai 44 anni (4% dei casi, quinta neoplasia più frequente).<sup>31-32</sup>

L'incidenza globale e i tassi di mortalità dipendono strettamente dai programmi di screening per le lesioni precancerose e della vaccinazione contro il papillomavirus umano (HPV), entrambi maggiormente disponibili nei Paesi industrializzati. Infatti, negli ultimi 50 anni, grazie a questi interventi, nei Paesi industrializzati è stata registrata una riduzione dell'incidenza (circa 75%) e della mortalità da tumore cervicale.<sup>33</sup>

Inoltre, è stato osservato che la maggioranza dei carcinomi cervicali viene rilevata in donne mai sottoposte o sottoposte in modo irregolare al Pap test. Questa osservazione fa emergere l'importanza nella diagnosi di questo tumore nelle sue fasi precoci.

Il carcinoma in situ presenta la massima incidenza intorno ai 25-35 anni riducendosi progressivamente nelle fasce d'età successive fino a scomparire oltre i 65 anni.

Il carcinoma invasivo, invece, presenta un'incidenza variabile nelle varie fasce d'età: è praticamente assente sotto i 20 anni, sale tra i 20 e 40 anni con un'incidenza da 4 a 16 casi per 100.000 donne, raggiunge il picco tra i 40 e i 65 anni con 16 casi ogni 100.000 donne, oltre ai 65 anni torna a scendere.<sup>34, 35</sup>

## Le lesioni preneoplastiche e neoplastiche cervicali

Innanzitutto, distinguiamo più chiaramente il significato di “lesione preneoplastica” e di “carcinoma invasivo” a livello cervicale (Fig. 8).

**Lesione preneoplastica:** la lesione non è evidente macroscopicamente, ma il sospetto nasce a seguito di un Pap test o di HPV DNA test positivo; le cellule cancerizzate dell’epitelio non hanno ancora superato la *membrana basale* che separa l’epitelio stesso dallo stroma, ovvero non hanno invaso i tessuti sottostanti e non hanno potenziale metastatico.

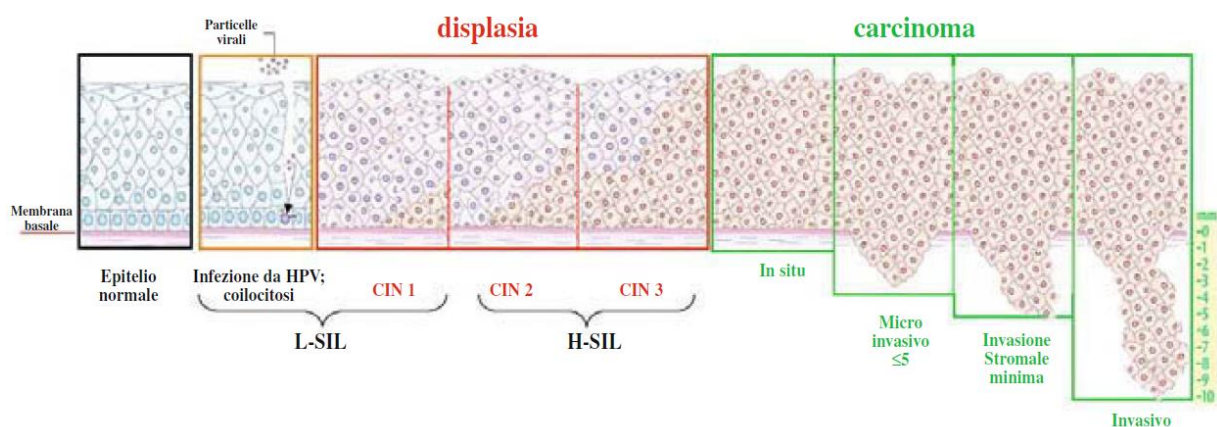


Fig. 8 – Rappresentazione schematica dell’evoluzione delle lesioni cervicali HPV-relate

**Carcinoma invasivo (carcinoma infiltrante squamoso):** la lesione è macroscopicamente evidente e le cellule neoplastiche dell’epitelio hanno superato la membrana basale penetrando il tessuto connettivo e, di conseguenza, anche i vasi linfatici e/o sanguigni.

Le lesioni preneoplastiche sono entità subcliniche, non visibili ad occhio nudo, che precedono il tumore invasivo, la cui diagnosi definitiva è sempre di tipo istologica.<sup>4, 10</sup>

Vengono distinte in:

- *Lesioni di basso grado:* la maggior parte regrediscono spontaneamente, ma andrebbero controllate nel tempo in modo da monitorarne il comportamento evitando interventi chirurgici potenzialmente dannosi;
- *Lesioni di alto grado:* la regressione spontanea è più rara e pertanto si rende quasi sempre necessaria la loro asportazione.

HPV è più frequentemente associato alla cervice uterina, tuttavia occorre ricordare che colpisce anche altre sedi anatomiche, come vagina, vulva, ano, pene e tratto oro-faringeo, determinando lesioni preneoplastiche e/o neoplastiche.

L'acronimo **CIN** sta per *Cervical Intraepithelial Neoplasia*, analogamente si possono verificare **VaIN** (*Vaginal Intraepithelial Neoplasia*), **VIN** (*Vulvar Intraepithelial Neoplasia*), **PaIN** (*Perianal Intraepithelial Neoplasia*), **AIN** (*Anal Intraepithelial Neoplasia*) e, sebbene molto più raramente, anche il partner maschile può essere colpito da **PeIN** (*Penile Intraepithelial Neoplasia*) (Fig 9).

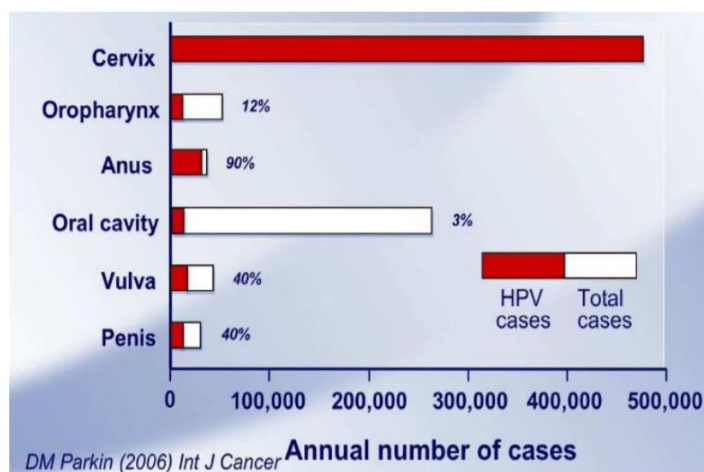


Fig. 9 – Numero di casi di lesioni HPV-relate in tutte le sedi anatomiche interessate dal virus

### Classificazione delle lesioni cervicali

Le lesioni displastiche precancerose della cervice uterina appartengono a due grandi famiglie:

- **Esocervice:** lesioni dell'epitelio squamoso, detta anche neoplasia cervicale intraepiteliale (*Cervical Intraepithelial Neoplasia* - CIN)
- **Endocervice:** lesioni dell'epitelio colonnare, detta anche neoplasia ghiandolare cervicale (*Cervical Glandular Intra-epithelial Neoplasia* – CGIN oppure *endocervical glandular dysplasia* – EGD)

È da precisare che mentre la progressione neoplastica nell'esocervice, ovvero dell'epitelio squamoso pluristratificato, è ben definita e nota, per l'endocervice, ovvero per l'epitelio colonnare, il discorso è più complicato e meno noto. Il motivo è che l'infezione nell'esocervice è di tipo produttivo, ovvero porta alla produzione di virioni infettanti, per l'endocervice non è così.<sup>36</sup>

Infatti, le cellule dell'endocervice, pur essendo infettate dall'HPV, l'infezione in queste cellule non è produttiva.

Per questo motivo la progressione neoplastica dell'esocervice segue un modello noto e consolidato, per l'epitelio colonnare questo modello è meno consolidato. Gli autori anglosassoni hanno proposto il termine "CGIN", distinta in un basso grado e alto grado; mentre gli autori americani, con approvazione del WHO, propongono il termine "EGD", anch'essa distinta in un basso grado e alto grado.

Per l'esocervice occorre cercare nell'epitelio squamoso le *cellule basaloidi*, ovvero cellule displastiche con atipie cito-cariologiche. Le cellule basaloidi sono limitate al terzo basale e caratterizzano le lesioni **CIN1** (displasia lieve). Quando gli elementi basaloidi raggiungono il terzo medio, si ha una lesione **CIN2** (displasia moderata) in cui si possono evidenziare le cellule tipiche delle lesioni cervicali, ovvero i coilociti. Quando le cellule basaloidi sono presenti in tutto lo spessore cervicale, raggiungendo lo strato luminale, si ha una lesione **CIN3** (displasia grave) che equivale a dire carcinoma intraepiteliale.<sup>37</sup>

Per quanto riguarda l'epitelio ghiandolare, come detto, la progressione neoplastica è meno definita e, anzi, più complessa. Innanzitutto, l'epitelio ghiandolare risente molto dell'infiammazione della cervice uterina. È meno definita perché da una parte abbiamo la displasia ghiandolare di basso grado la cui morfologia è molto simile e difficilmente distinguibile dalle lesioni displastiche di significato riparativo-reattivo e non neoplastico; mentre le lesioni displastiche endocervicali di alto grado sono difficilmente distinguibili dall'adenocarcinoma in situ, che è l'unico precursore noto dell'adenocarcinoma invasivo.

Pertanto, riassumendo, le lesioni preneoplastiche cervicali si suddividono in:

- *Lesione di basso grado*: **CIN 1** o displasia lieve
- *Lesione di alto grado*: **CIN 2** o displasia moderata e **CIN 3** o displasia grave fino al **carcinoma in situ (CIS)**.

Individuate precocemente, le lesioni preneoplastiche sono curabili con interventi conservativi finalizzati all'asportazione dei tessuti coinvolti, che rispettano la funzionalità riproduttiva della donna.<sup>37</sup>

Come detto, quando il carcinoma supera la *membrana basale*, che divide gli epiteli dallo stroma, il tumore diventa invasivo. A questo punto il cancro si distingue in due forme che hanno un significato clinico molto diverso:

- Il **carcinoma microinvasivo** (Stadio I A), ovvero una lesione neoplastica minimamente invasiva, che infiltra lo stroma per pochi millimetri e per questo è già capace di metastatizzare, anche se è confinata alla lamina basale; è ulteriormente classificabile in:
  - o *Stadio I A1*, quando l'invasione stromale è  $\leq 3$  mm in profondità
  - o *Stadio I A2*, quando l'invasione stromale è  $> 3$  mm  $\leq 5$  mm in profondità
- Il **carcinoma francamente invasivo** (*Stadi dal I B al IV*): oltre i 5 mm di invasione stromale

Nel primo caso l'approccio terapeutico può essere conservativo, mentre nel secondo caso si deve necessariamente ricorrere alla chirurgia radicale, alla chemioterapia, alla radioterapia (secondo specifici protocolli e schemi terapeutici, in base alla situazione specifica).<sup>38</sup>

### ***Classificazione citologica secondo il sistema Bethesda*** <sup>39</sup>

La classificazione più utilizzata è quella di Bethesda (definita *Bethesda system*), che utilizza una terminologia più uniforme capace di fornire chiare indicazioni per la gestione clinica.

La terminologia "CIN" (neoplasia cervicale intraepiteliale) è stata sostituita con la più appropriata **SIL** (*Squamous Intraepithelial Lesion*), suddivise in lesioni a basso grado (**Low SIL**), che corrispondono alle CIN 1 della classificazione precedente, e lesioni ad alto grado (**High SIL**), che corrispondono alle CIN 2 - CIN 3.

La classificazione introduce la categoria "**ASCUS**", ovvero cellule squamose atipiche di significato indeterminato, per indicare anomalie cellulari non sufficienti a supportare la diagnosi di "SIL".

Un'altra categoria introdotta è l'"AGUS", ovvero cellule ghiandolari atipiche di significato indeterminato, sostituita col termine "**AGC**" (cellule ghiandolari atipiche) nella revisione del 2001 per evitare confusione con ASCUS.

L'evidenza di cellule ghiandolari atipiche è importante sul piano clinico perché la probabilità di associazione con alterazioni di grado elevato è più frequente rispetto agli ASCUS.

Quindi queste ultime categorie ASCUS/AGUS hanno più un significato di invito al follow-up, piuttosto che di segnalazione di un quadro patologico soggetto ad un trattamento chirurgico.<sup>39</sup>

### *Cofattori coinvolti nella carcinogenesi*

L'infezione di HPV ad alto rischio è un fattore *necessario, ma non sufficiente*, per poter avere la manifestazione di lesioni preneoplastiche e l'eventuale sviluppo del carcinoma cervicale.<sup>40</sup>

Oltre all'infezione, infatti, esistono numerosi altri fattori, esogeni ed endogeni, che influenzano sia la storia naturale dell'infezione stessa sia il rischio di progressione della neoplasia.

Essi possono essere suddivisi in tre gruppi:

1. **Cofattori legati all'HPV**, ovvero il genotipo infettante, la carica virale, l'integrazione virale, la coinfezione e la presenza di trascritti oncogeni;
2. **Cofattori legati all'ospite**, compresi i livelli ormonali endogeni, i fattori genetici legati all'HLA ed altri fattori legati alla risposta immunitaria dell'ospite;<sup>41</sup>
3. **Cofattori ambientali o esogeni**, che includono l'utilizzo di contraccettivi orali, il fumo di sigaretta, la dieta, i traumi cervicali, le coinfezioni con il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e/o con altri patogeni trasmessi sessualmente.

I cofattori legati all'HPV sono quelli che verranno presi in considerazione in questa tesi.

### *Fattori di rischio e fattori preventivi*

Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato quanto il cancro della cervice sia strettamente associato all'attività sessuale. Durante un rapporto sessuale in cui uno dei due partner sia infetto, il contatto fisico genitale può permettere la trasmissione del virus. Il contagio è quindi favorito dalla promiscuità sessuale o da rapporti con partner a rischio.

I più importanti fattori di rischio sono:<sup>42</sup>

- Il numero elevato di partner;
- L'età precoce del primo rapporto sessuale;
- Il comportamento sessuale del partner.

È diventato sempre più chiaro che tali comportamenti riflettono la maggiore probabilità d'acquisire un'infezione da HPV.

Oltre all'infezione da HPV, legata al comportamento sessuale, altri fattori sono considerati importanti nella genesi del carcinoma cervicale: <sup>42</sup>

- Fumo;
- Uso di contraccettivi orali;
- Multiparità;
- Alimentazione scorretta;
- Co-infezioni con HIV;
- Co-infezioni con altri agenti di malattie sessualmente trasmesse.

In particolare, il fumo è stato classificato dalla IARC come carcinogeno per la cervice uterina. Le fumatrici attuali hanno un rischio più elevato di sviluppare un carcinoma squamo cellulare della cervice uterina rispetto alle non fumatrici. I possibili meccanismi alla base del fumo includono: una riduzione della risposta immunitaria a livello della cervice uterina, effetti correlati al metabolismo degli ormoni femminili e un danno genetico diretto causato da carcinogeni presenti nel tabacco.

La multiparità e una dieta povera di principi protettivi (come ad esempio: vitamina C, vitamina B12, beta e alfa carotene) contribuiscono ad aumentare il rischio di cancro alla cervice. Questi fattori, ampiamente riscontrati nelle donne nei paesi in via di sviluppo, potrebbero contribuire a spiegare l'elevata incidenza del cancro della cervice in queste regioni.

Il ruolo specifico di altri agenti infettivi nella genesi del carcinoma cervicale è stato analizzato in numerosi studi epidemiologici. Gli agenti infettivi sessualmente trasmessi per i quali è stata evidenziata un'associazione col carcinoma cervicale sono HSV2, *Chlamydia trachomatis* e HIV. <sup>43</sup>

### *Capitolo 3 - SCREENING DEL CARCINOMA CERVICALE E DIAGNOSI DELLE INFEZIONI DA HPV*

Appare sempre più chiaramente che la carta vincente per la battaglia contro il cancro della cervice uterina, così come per tutti i tipi di cancro, è la **prevenzione**.

Il tumore origina dalle lesioni precancerose e offre un lungo periodo di tempo in cui poter intervenire sulle anomalie benigne prima che ci sia la trasformazione tumorale.

Ci sono due strategie preventive:

- Vaccinazione HPV (prevenzione primaria);
- Screening (prevenzione secondaria), mediante Pap test e HPV DNA test.

#### *Strategie di prevenzione secondaria – Lo screening*

Per *screening* si intende un “intervento sanitario che si propone di diagnosticare una malattia precocemente, cioè prima che compaiano sintomi o segni (diagnosi precoce oppure anticipazione diagnostica), oppure di identificare ed eliminare i precursori (prevenzione secondaria) in modo da ottenere la diminuzione della mortalità”.<sup>44</sup>

Un programma di screening è un insieme complesso di attività che comprende, oltre all’esecuzione materiale del test, l’informazione e l’educazione della popolazione da controllare, l’organizzazione di modalità che facilitino l’accesso al test e, per le persone con test positivo, la predisposizione e attivazione di protocolli diagnostici, terapeutici e di follow-up.

Nel caso del carcinoma alla cervice, con lo screening ci si propone di identificare le lesioni che precedono la comparsa del carcinoma per eliminarle, evitando quindi lo sviluppo del tumore.

In molti Paesi è stato introdotto uno *screening organizzato*, che ha portato ad una notevole riduzione dell’incidenza di questo tumore.<sup>45</sup>

Uno degli aspetti di maggiore interesse nella clinica del cancro alla cervice uterina è legato alla possibilità di effettuare la diagnosi precoce piuttosto facilmente che permette di individuare una neoplasia quando ancora non ha dato manifestazioni cliniche rilevabili durante la semplice visita ginecologica.

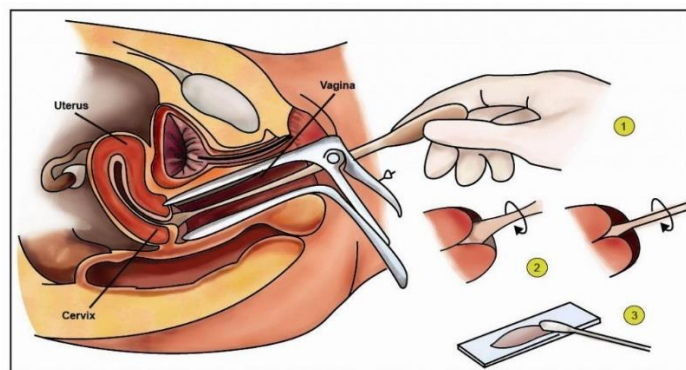
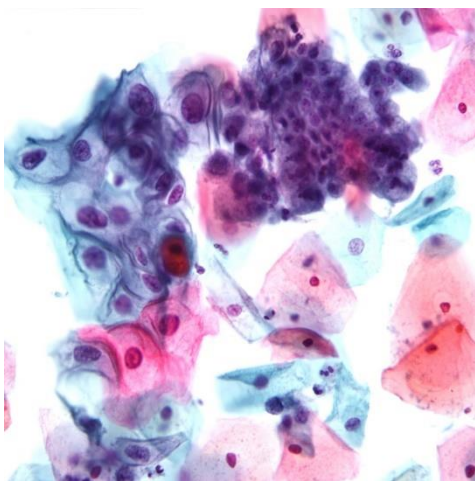
Tuttavia, questi programmi di screening non sono attuabili ovunque, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo, portando a mantenere alta l’incidenza del carcinoma al collo dell’utero.



Sono due i test di screening considerati di **primo livello**, il PAP test e l'HPV DNA test. Entrambi portano alla identificazione delle lesioni precancerose cervicali, alterazioni tissutali benigne che precedono il tumore.

### *Il Pap test*

Il **Pap test** è stato messo a punto da Georgos Papanicolaou nel 1923 e introdotto negli anni 40 per lo screening della cervice uterina; ha dato una svolta decisiva alla storia di tale patologia e ha permesso una riduzione del 20-60% della mortalità del carcinoma.<sup>46</sup>



*Fig. 10 – A sinistra un esempio di colorazione di Papanicolaou su un campione citologico. A destra un'immagine descrittiva degli strumenti e azioni necessarie allo svolgimento del Pap test.*

La procedura di svolgimento del Pap test tradizionale si basa su un prelievo di cellule di sfaldamento mediante l'uso di un'apposita spatola e andando il più vicino possibile alla zona di trasformazione, ovvero alla giunzione squamo-colonnare. Il materiale così prelevato viene strisciato su un vetrino porta oggetti e fissato con un fissativo spray a base alcolica. Lo striscio viene poi colorato con il metodo di Papanicolaou e analizzato al microscopio per indagare la presenza di alterazioni da infezione di HPV. L'interpretazione dell'esame è formulata dal clinico, patologo o citopatologo, che, in caso di presenza di anomalie cellulari, dovrà consigliare alla paziente un successivo approfondimento attraverso l'indagine coloscopica e, se necessario, un prelievo bioptico per analizzare le cellule atipiche.<sup>46</sup>

L'effetto citopatico di HPV è rappresentato da cellule caratteristiche definiti *coilociti*, che esfoliano dalle lesioni. Si tratta di cellule pavimentose caratterizzate da un ampio citoplasma e un alone perinucleare bianco a margini netti e circondato da citoplasma generalmente denso. I nuclei sono lievemente ingranditi con cromatina pallida, ma più frequentemente ipercromatici e picnotici. Essi sono sempre di dimensioni aumentate rispetto alle cellule pavimentose normali e riducono il citoplasma man mano che il grado della lesione progredisce. I nucleoli non sono visibili nelle lesioni di basso grado (CIN 1) e cominciano a farsi evidenti nelle alterazioni più avanzate (CIN 2 e CIN 3). La loro comparsa indica che la lesione sta progredendo in senso neoplasico.

Secondo le indicazioni dell'Osservatorio nazionale screening, in Italia si propone il Pap test ogni tre anni alle donne con un'età compresa tra i 25 e i 64 anni. Si ritiene che non sia necessario eseguire il Pap test prima dei 25 anni in quanto le infezioni da HPV sono molto frequenti nelle fasce di età più giovani, ma nella quasi totalità dei casi regrediscono spontaneamente. Dunque, sottoporsi all'esame si correrebbe il rischio di sottoporre inutilmente le ragazze a ulteriori esami non esenti da rischi.

Questo test ha il vantaggio di essere un esame accettabile dalla donna per il minimo grado di invasività che lo caratterizza e i costi per la società sono contenuti; tuttavia, nonostante il miglioramento delle tecniche analitiche, il metodo non è immune da errori. Infatti, presenta circa il 5-10% di risultati incerti o anomali, dovuti all'interpretazione del vetrino, al campionamento e soprattutto non è un esame di tipo predittivo, oltre ad avere una bassa specificità, sensibilità e riproducibilità. Ciò può portare alla conseguente necessità di dover ripetere il test e, eventualmente, effettuare esami addizionali di conferma, quali la colposcopia e la biopsia.<sup>47</sup>

I falsi negativi possono essere dovuti ad errori associati al prelievo, alla preparazione, all'interpretazione o ai limiti della tecnica stessa. I falsi positivi, invece, possono essere dovuti a reperti interpretati erroneamente come positivi per alterazioni cellulari che non derivano dal virus HPV, bensì, ad esempio, da stati infiammatori che possono portare ad un quadro morfologico simile.<sup>48</sup> Per questo motivo, affinché si possa migliorare la sensibilità del test, è stato raccomandato di associare il Pap test con la ricerca molecolare del DNA attraverso l'HPV DNA test nei programmi di screening delle donne con più di 30 anni.

Accanto a questi aspetti, però, l'efficacia dei programmi di screening è evidente. È sufficiente analizzare i dati di incidenza del carcinoma cervicale invasivo registrati prima e dopo la sua introduzione: tra 1988 e il 1995, l'incidenza si è ridotta del 40%.<sup>47</sup>

La chiave di questo successo è rappresentata da un programma sistematico di chiamata/riciamata rivolto a tutte le donne che ricevono un regolare invito; un programma di controllo qualità per ogni fase del processo di screening, dal prelievo alla lettura del vetrino, alla gestione colposcopica; un approccio multi-disciplinare che coinvolge i ginecologi, i medici di medicina generale, le infermiere, i citopatologi; una valutazione del programma da parte delle donne e infine la disponibilità di fondi adeguati. Senza questa attenzione, anche ai dettagli, lo screening diventerebbe meno efficace e rischierebbe di essere addirittura dannoso, soprattutto per le donne giovani, con un basso rischio di cancro, che verrebbero sovra trattate per anomalie lievi.

Il Pap test consente di attuare una profilassi secondaria volta a ridurre la prevalenza (frequenza di casi esistenti) del tumore alla cervice poiché permette la rilevazione degli stadi precancerosi, a differenza della profilassi primaria che, invece, ha come scopo quella di agire sulla diminuzione dei fattori di rischio della malattia riducendone l'incidenza (comparsa di nuovi casi).

Tra delle criticità principali del Pap test troviamo la qualità del preparato da analizzare. È noto che la maggior parte degli strisci negativi sono il risultato di errori di campionamento e che l'accuratezza della diagnosi citologica può essere compromessa da fattori quali materiale scarso o troppo spesso, granulociti e/o eritrociti che oscurano il materiale cellulare, o da cattiva fissazione.<sup>46</sup>

Negli ultimi anni alcune tecniche innovative sono state introdotte con lo scopo di ridurre i falsi negativi; tra queste la *citologia in strato sottile ThinPrep 2000*.<sup>49</sup> La percentuale dei preparati "adeguati" aumenta dall'85% dei Pap test convenzionali al 97% dei Pap test con ThinPrep 2000. Tuttavia, anche questa metodica di allestimento presenta vantaggi e svantaggi. Tra i vantaggi troviamo sicuramente una migliore fissazione delle cellule, una più facile visualizzazione grazie all'assenza di sovrapposizione cellulare, diminuzione degli elementi infiammatori ed ematici che disturbano la lettura. Tra gli svantaggi, invece, troviamo spesso un minor quantitativo di materiale diagnostico rispetto al Pap convenzionale e un costo più elevato.

Grazie al ThinPrep 2000 l'esame citologico evidenzia molto più spesso le SIL e questo conferma che l'alta definizione della citologia in strato sottile fa sicuramente diminuire i falsi negativi. Con l'uso del ThinPrep 2000 le diagnosi di SIL sono quasi triplicate.<sup>50</sup>



Fig. 11 – A sinistra, il materiale utilizzato nella metodica del ThinPrep 2000. A destra, un esempio di come è evidente la differenza al microscopio di un campione citologico eseguito manualmente, con uno processato tramite ThinPrep 2000

Lo screening si è sicuramente dimostrato fino ad ora la strategia migliore nella prevenzione del cancro del collo dell'utero e l'introduzione della vaccinazione contro l'HPV non ne deve assolutamente attenuare l'implementazione e la diffusione. Nonostante esista il problema relativo alla limitata sensibilità e specificità del test, l'introduzione dei programmi di screening di popolazione tramite Pap test ha dimostrato di ridurre dal 60 al 90% entro tre anni l'incidenza del cancro del collo dell'utero.

Esiste una marcata differenza di incidenza della malattia tra i Paesi che hanno realizzato programmi efficienti di screening e quelli che non l'hanno fatto. I problemi sono semmai rappresentati dalla diffusione dei programmi di screening. La metà delle donne americane che hanno avuto diagnosi di cancro del collo dell'utero non si erano mai sottoposte a screening ed un ulteriore 10% non lo aveva fatto negli ultimi 5 anni, oppure avendolo fatto, non si erano sottoposte agli accertamenti ed alle cure necessarie in caso di Pap test anormale.

Va ricordato che in tutto il mondo le donne appartenenti ai livelli sociali più bassi sono quelle maggiormente colpite dal cancro del collo dell'utero.

## HPV DNA test

L'HPV DNA test è un test che identifica la presenza del DNA di HPV nelle cellule cervicali. In particolare, è un test che ricerca solo i tipi virali ad alto rischio.

Le cellule vengono raccolte seguendo la stessa modalità del Pap test, ma a differenza di quest'ultimo, vengono lette direttamente da uno strumento di laboratorio. La positività di questo test indica la presenza di HPV nella cervice uterina. Viene fornito un valore quantitativo in modo che si possa interpretare la possibilità di sviluppare o meno nel breve periodo un'alterazione precancerosa.

Il test HPV è stato introdotto per le donne con risultati del Pap test leggermente anormali, ma anche per confermare i risultati negativi del Pap test e poter, così, escludere le donne da ulteriori accertamenti diagnostici più invasivi.

Il test HPV può essere usato anche come test di screening per le donne sopra i 30 anni, da solo o in associazione al Pap test; dal momento che indica non solo la presenza delle lesioni precancerose, ma anche la predisposizione a svilupparle, la negatività del test HPV permette di allungare l'intervallo tra due screening per un tempo compreso dai tre ai cinque anni.<sup>51</sup>

Ad oggi esistono varie tecniche per la tipizzazione dell'HPV caratterizzate da differenti sensibilità. Nei programmi di screening la metodica maggiormente utilizzata è la *Hybrid Capture II (HC 2)*.<sup>52</sup> Questo metodo rileva la presenza di HPV 16 e 18, ovvero i ceppi ad alto rischio più frequentemente coinvolti nelle lesioni cervicali.

Per fare l'HPV DNA test occorre prelevare un campione di cellule dal collo dell'utero in un modo simile a come si prelevano nel Pap test tradizionale. Il materiale prelevato è immerso in un liquido e sottoposto ad un esame di laboratorio che ricerca il DNA dei tipi HPV ad alto rischio.

Si tratta di un saggio che amplifica il segnale di ibridazione e permette la quantizzazione del virus attraverso tecniche di chemiluminescenza basate sull'uso di anticorpi. È utilizzata una miscela di sonde marcate e consente la simultanea determinazione di genotipi ad alto e basso rischio oncogeno attraverso l'ibridazione del DNA virale eventualmente presente nel campione.

Il rilevamento della reazione avviene attraverso l'uso di un anticorpo secondario, che riconosce quello monoclonale, coniugato con fosfatasi alcalina. Successivamente, viene aggiunto un substrato chemiluminescente che, metabolizzato dalla fosfatasi alcalina, emette fluorescenza.

L'HPV DNA test è più sensibile del Pap-test nell'identificare le lesioni preneoplastiche, ma meno specifico, per cui *può determinare l'invio a colposcopia di un maggior numero di donne, soprattutto di giovane età, in cui poi non si riscontra alcuna lesione.*

Nel programma di screening l'HPV DNA test è utilizzato routinariamente come test di completamento quando nel PAP test sono presenti cellule di significato incerto (cellule ASC-US).

Deve essere comunque ricordato che l'HPV DNA test può risultare negativo in presenza di un'infezione da HPV a basso titolo (quantità di HPV così piccole da non poter essere rilevate) ed in questo caso potrebbe succedere che il test diventi positivo a un controllo successivo, oppure in presenza di un'infezione da tipi HPV ad alto rischio ma non compresi in quelli testati.<sup>53</sup>

### *Colposcopia e biopsia cervicale*

Nel momento in cui la donna, sottoponendosi agli esami di screening di primo livello rileva un esito anomalo o positivo, va incontro ad indagini ulteriori considerate di **secondo livello**: la colposcopia con biopsia e la conizzazione.

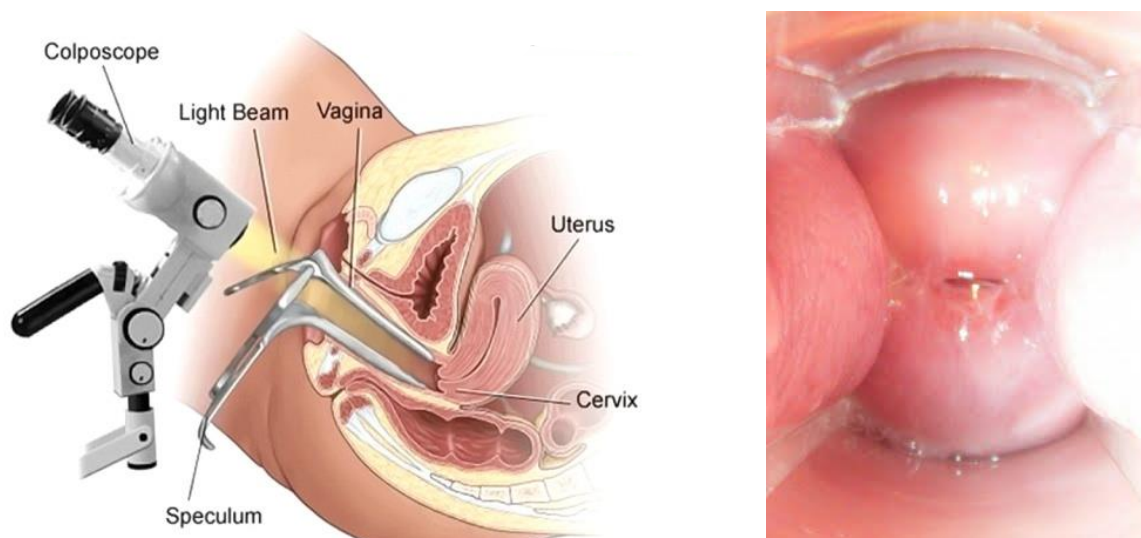
La **colposcopia** è un'indagine clinica che consente la valutazione *visiva* della cervice uterina e localizzare la presenza della lesione per poter eseguire successivamente il prelievo "mirato" di un campione tissutale da analizzare istologicamente.

Riveste un ruolo importante nei programmi di screening per il carcinoma cervicale dal momento che costituisce l'indagine di riferimento per la valutazione di *secondo livello* dei Pap test anormali.

In caso di un esame citologico anormale, prima di adottare un protocollo terapeutico, è necessario localizzare la lesione dove eventualmente eseguire la biopsia per il successivo approfondimento istologico.<sup>54</sup>

La colposcopia, quindi, ha proprio lo scopo di localizzare la presenza di eventuali lesioni precancerose o microinvasive della cervice.

Nell'ambito dei programmi di screening viene consigliata a tutte le pazienti con Pap test anormale.



*Fig. 11 – A sinistra, immagine della strumentazione necessaria per svolgere la colposcopia. A destra, l'immagine di una cervice sana vista al colposcopio.*

La colposcopia consente di esaminare il collo dell'utero attraverso il *colposcopio*, uno strumento costituito da lenti che permette di ingrandire l'area da analizzare fino a 60 volte (Fig. 11).

I tessuti visualizzati sono sottoposti ad un trattamento a base di coloranti capaci di evidenziare le eventuali lesioni preneoplastiche del tessuto della cervice e di effettuare successivamente il prelievo biotico mirato.<sup>55</sup>

Il colposcopio, utilizzando appositi ingrandimenti, consente di osservare gli aspetti del connettivo sottoepiteliale e lo spessore assunto dall'epitelio squamoso o quello cilindrico, soprattutto a livello della giunzione squamo-colonnare. Dopo una prima osservazione, si ripete dopo una detersione della zona con acido acetico al 3%. Questo ha sia la funzione di pulizia dell'area di interesse permettendo l'eliminazione delle secrezioni che possono rendere difficoltosa la visione della mucosa e, inoltre, fa acquisire all'epitelio squamoso normale un colorito rosa brillante, mentre a quello atipico o displasico un colorito biancastro.

Successivamente si passa al test di Lugol o test di Shiller utilizzando un colorante a base di iodio, che colora l'epitelio squamoso normale, ricco di glicogeno, di color bruno mogano.

In questo modo si facilita il riconoscimento della giunzione squamo-colonnare in quanto l'epitelio cilindrico cervicale non prende lo iodio e rimane chiaro, mentre l'epitelio squamoso neoplastico e quello alterato per quadri flogistici sono poveri di glicogeno e non si colorano in bruno mogano, rimangono cioè iodo-negativi.

La **biopsia cervicale**, a cui segue l'esame istologico del tessuto prelevato, viene eseguita in caso di Pap test positivo o dubbio e/o di esame colposcopico che mette in evidenza lesioni precancerose. Il prelievo mirato va attuato sotto la guida colposcopica.<sup>56</sup>

Al fine di escludere che nell'endocervice ci siano zone di atipia sfuggite all'esame colposcopico, alla biopsia mirata si associa il *curettaggio* endocervicale in modo da permettere al patologo la possibilità di effettuare un esame istologico anche di questa zona.

Il **curettaggio** endocervicale è un tipo di biopsia, o una sorta di raschiamento, della zona endocervicale. Viene eseguito attraverso uno strumento a forma di cucchiaio chiamato *curetta* che viene utilizzato per raschiare il rivestimento del canale endocervicale (il passaggio tra la cervice e l'utero).

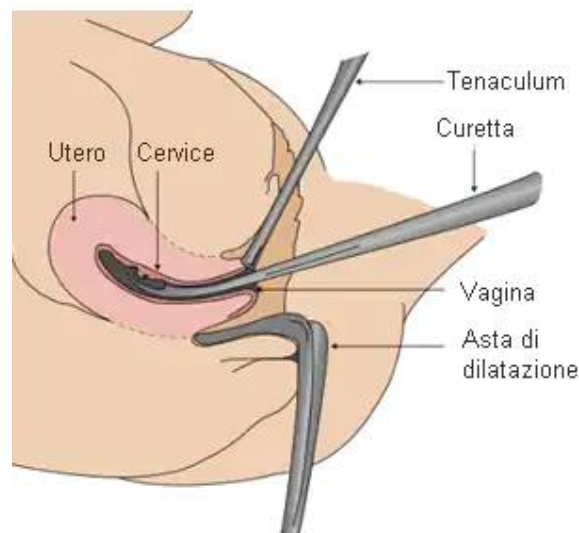


Fig. 12 – Immagine della strumentazione necessaria per svolgere il curettaggio



## Conizzazione

Se la biopsia conferma la presenza di displasia associata ad infezione virale da HPV, si può eseguire una biopsia *escissionale* della zona di trasformazione con la tecnica di secondo livello chiamata **conizzazione**.

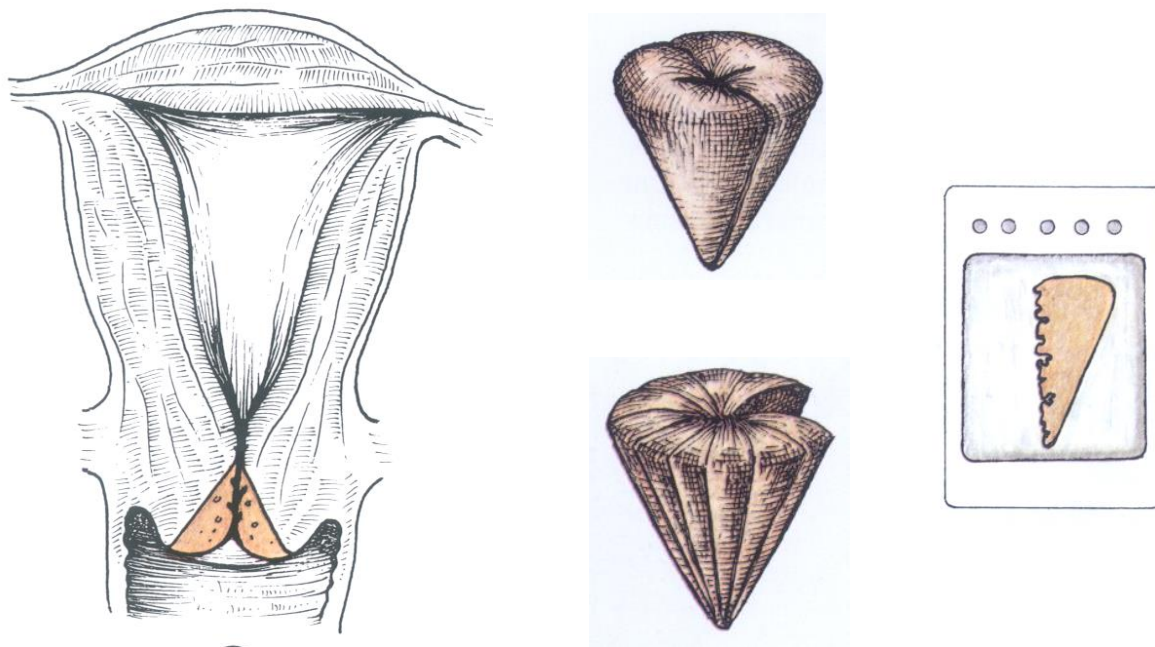
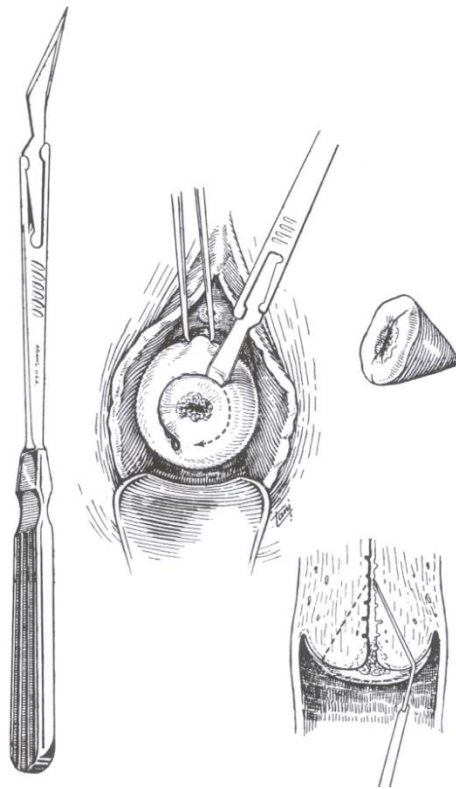


Fig. 13 – Immagini relative alla procedura di conizzazione. A sinistra si evidenzia il punto in cui è stata effettuata la cono-biopsia. A destra, esempi di come si presenta il prelievo cuneiforme e l'orientamento del tessuto che deve avere nel blocchetto di paraffina per consentire l'analisi istologica.

Come detto in precedenza, il protocollo di screening prevede che le donne eseguano il Pap test o l'HPV DNA test, che sono esami di primo livello. Se gli esami di primo livello danno un risultato anomalo o positivo, le donne passano ad indagini di secondo livello, ovvero la colposcopia con biopsia. Se l'esito della biopsia è CIN1, la lesione non viene trattata, ma viene monitorata; mentre se l'esito è CIN2 o CIN3, allora occorre trattarle in quanto sono lesioni ad alto rischio di progressione. Qualora non venissero trattate, le lesioni CIN2 e CIN3 hanno alta probabilità di aumentare la loro gravità fino a portare allo sviluppo di un carcinoma invasivo. In questi casi, quindi, occorre svolgere il trattamento chirurgico della conizzazione, considerato terapeutico.

La cono-biopsia è un prelievo cuneiforme di tessuto cervicale e determina la rimozione di tutta la giunzione squamo-colonnare, che, come detto, è l'area più soggetta a trasformazione neoplastica a seguito di infezione da HPV.<sup>57</sup>

Il prelievo viene poi incluso in paraffina per la successiva analisi istologica, che analizzerà sia l'esocervice che l'endocervice, ma soprattutto il patologo deve verificare che i margini siano liberi da displasie. Qualora, invece, i margini mostrassero cellule displastiche, è altamente probabile che la donna recidiverà localmente.



*Fig. 14 – Immagine della strumentazione e della procedura di conizzazione mediante il metodo della lama fredda (in alto) e con l'ansa diatermica (in basso)*

Nell'immagine si mostra la procedura della conizzazione utilizzando un vecchio metodo della "lama fredda", ovvero con un bisturi. Oggi, invece, la procedura utilizza *un'ansa diatermica*, ovvero un filo tagliente dentro cui passa la corrente elettrica in grado di tagliare e coagulare nello stesso tempo. Anche se la procedura della cono-biopsia è piuttosto semplice, non è scevra da complicazioni. Le complicazioni possono essere immediate (es. sanguinamenti profusi) o tardive (es. stenosi del canale cervicale). Pertanto, la conizzazione è una procedura chirurgica invasiva che va eseguita solo nei casi in cui esiste una reale necessità, ovvero quando la donna ha un rischio concreto di progredire verso il cancro. Ciò accade quando il genoma di HPV si è integrato in quello della cellula ospite determinandone l'immortalizzazione, condizione che predispone un accumulo di danni cellulari e, quindi, alla nascita di cellule cancerose.<sup>58</sup>

Tutti i trattamenti debbono essere colposcopicamente guidati, al fine di essere radicali sulle lesioni e conservativi sui tessuti sani. Infatti, la diffusione della CIN/SIL in donne sempre più giovani, che non hanno ancora completato il loro programma riproduttivo ha portato all'esecuzione di interventi sempre più conservativi. Questi sono usualmente eseguiti in anestesia locale, in regime ambulatoriale o di day surgery, guidati colposcopicamente al fine di essere il più radicali possibile sulla lesione, ma contemporaneamente il più conservativi possibile sui tessuti sani.<sup>58</sup> *Nelle donne in età fertile, infatti, l'obiettivo principale è quello di eradicare le lesioni senza alterare le capacità riproduttive delle pazienti.*

Gli interventi dovrebbero comportare scarse complicanze precoci e tardive, e solo in casi particolari può essere presa in considerazione l'anestesia generale o l'ospedalizzazione ordinaria, comunque con un numero cumulativo di giornate di degenza molto basso.

## Capitolo 4 - PROFILASSI CONTRO L'HPV

### Strategie di prevenzione primaria: il vaccino anti-HPV

Per molti anni è stato difficile allestire vaccini anti-HPV in quanto questi virus non crescono efficacemente in culture cellulari. Nel 1991, Zhou e collaboratori hanno dimostrato che le proteine L1 del capsido dell'HPV 16 sono in grado di formare Particelle Simil-Virali. (VLP, Virus-Like Particles). Tutti i vaccini sviluppati fino ad oggi sono costituiti da L1 VLP. Le VLP mimano il capsido virale, ma non contengono materiale genetico dei virus; pertanto, sono in grado di indurre una risposta anticorpale specifica per tipo di HPV, a seconda delle proteine utilizzate, ma non sono in grado di provocare infezioni.<sup>59</sup>

I vaccini immessi sul mercato sono tre:

Sono stati sviluppati tre diversi vaccini che proteggono da differenti tipi di HPV:

1. Vaccino **bivalente**: protegge contro i tipi di HPV 16 e 18. Il suo nome commerciale è CERVARIX™, prodotto dalla GlaxoSmithKline.
2. Vaccino **quadrivalente**: protegge contro i tipi di HPV 6, 11, 16 e 18. Il suo nome commerciale è GARDASIL®, prodotto dalla Merck.
3. Vaccino **9-valente**: oltre ai tipi di HPV del vaccino quadrivalente (6, 11, 16 e 18) protegge anche dai tipi 31, 33, 45, 52, e 58. Il suo nome commerciale è GARDASIL 9®.

Il vaccino contro l'HPV viene somministrato per via intramuscolare (sul braccio) in numero di dosi diverso a seconda dell'età del soggetto e della tipologia di vaccino usato, con le tempistiche previste dal calendario vaccinale del PNPV 2017-2019 e con le modalità già specificate nella Circolare del Ministero della Salute del 24 aprile 2014.

In particolare:

#### Vaccino bivalente<sup>60</sup>

- Dai 9 ai 14 anni: due dosi, una al mese 0 e una al mese 6; la seconda dose va somministrata dopo 5-7 mesi dalla prima dose;
- Soggetti con  $\geq 15$  anni: tre dosi, una al mese 0, una al mese 1 e una al mese 6; la seconda dose va somministrata dopo 1 e 2,5 mesi dalla prima dose, la terza dose da 5 a 12 mesi dopo la prima dose.

### Vaccino quadrivalente <sup>61</sup>

- Dai 9 ai 13 anni: due dosi, una al mese 0 e una al mese 6; se la seconda dose di vaccino viene somministrata prima di 6 mesi dalla prima dose, è raccomandata la somministrazione di una terza dose, in accordo alla schedula a 3 dosi (0, 2, 6 mesi). Gardasil® infatti, può essere somministrato anche secondo una schedula a 3 dosi (0, 2, 6 mesi: la seconda dose ad almeno 1 mese dalla prima dose e la terza dose almeno 3 mesi dopo la seconda dose; le tre dosi devono essere somministrate entro un periodo di 1 anno);
- Individui di età pari o superiore a 14 anni: tre dosi a 0, 2, 6 mesi rispettivamente; la seconda dose ad almeno 1 mese dalla prima dose e la terza dose almeno 3 mesi dopo la seconda dose; le tre dosi devono essere somministrate entro un periodo di 1 anno.

### Vaccino 9-valente <sup>62</sup>

- Soggetti di età compresa tra 9 e 14 anni:
  - Programma a 2 dosi: una dose al mese 0 e una tra il mese 5 e il mese 13 dalla prima dose; se la seconda dose di vaccino viene somministrata prima dei 5 mesi dalla prima dose, deve essere sempre somministrata una terza dose;
  - Programma a 3 dosi: una dose al mese 0, una al mese 2 e una al mese 6; la seconda dose deve essere somministrata non prima di 1 mese dalla prima dose e la terza dose non prima di 3 mesi dalla seconda dose. Il ciclo deve essere completato entro 12 mesi dalla prima dose.
- Soggetti di età = 15 anni: una dose al mese 0, una al mese 2 e una al mese 6; la seconda dose deve essere somministrata non prima di 1 mese dalla prima dose e la terza dose non prima di 3 mesi dalla seconda dose. Il ciclo deve essere completato entro 12 mesi dalla prima dose.

Il PNPV 2017-2019 <sup>63</sup> raccomanda anche di:

- Offrire il vaccino anti-HPV con tre dosi anche a coorti precedenti di ragazze adolescenti non vaccinate nel recente passato.
- Vaccinare le donne di 25 anni con vaccino anti-HPV, utilizzando l'invito per il primo screening per il carcinoma della cervice uterina.
- Effettuare la vaccinazione anti-HPV nei maschi omosessuali.

## *Strategia vaccinale in Italia*

L'intesa tra il Ministero della Salute e le Regioni del 2007 prevede l'offerta attiva e gratuita del vaccino alle bambine nel dodicesimo anno di età (dal compimento degli 11 anni fino al compimento dei 12 anni) su tutto il territorio nazionale. Contestualmente viene lasciata alle Regioni l'opportunità di considerare l'estensione dell'offerta attiva a ragazze di altre fasce d'età (18 o 25 anni).<sup>63</sup>

La strategia di rivolgersi alle dodicenni si basa sul presupposto che l'immunizzazione prima del debutto sessuale garantisca la massima efficacia del vaccino. Inoltre, così facendo è possibile rivolgersi a ragazze che frequentano la scuola dell'obbligo, facilitando l'offerta attiva anche a gruppi a rischio di deprivazione sociale, e consente di sfruttare le occasioni di contatto con le strutture vaccinali degli adolescenti già target di altri interventi vaccinali. Infine, facilita la comunicazione con le famiglie e permette di approfittare dell'influenza genitoriale, importante per programmi relativi a tematiche sensibili quali le malattie a trasmissione sessuale.

L'obiettivo di copertura nel target primario (le bambine dodicenni) era del 95% per 3 dosi di vaccino entro 5 anni dall'avvio dell'offerta. L'obiettivo non è stato raggiunto, in quanto la copertura vaccinale dopo oltre 5 anni dall'avvio del programma di immunizzazione è sembrata stabilizzarsi intorno al 74,1%, quindi nel Piano nazionale della Prevenzione Vaccinale (PNPV) 2012-2014 è stato rimodulato, prevedendo il raggiungimento di coperture vaccinali per ciclo completo di HPV:

- ≥ 70% nelle dodicenni a partire dalla coorte 2001
- ≥ 80% nelle dodicenni a partire dalla coorte 2002
- ≥ 95% nelle dodicenni a partire dalla coorte 2003

## *Efficacia dei vaccini profilattici anti-HPV*

La valutazione dell'efficacia dei vaccini nei protocolli clinici di fase II-III si è basata sulla quantificazione della riduzione dell'incidenza dell'infezione persistente da HPV vaccinale (due rilevazioni positive a distanza di almeno 4-6 mesi) e sulla riduzione dell'incidenza delle lesioni precancerose (CIN 2 e CIN 3) da genotipi di HPV vaccinali.

Poiché gli standard di cura internazionali di lesioni precancerose CIN2/3 richiedono la terapia ablativa e dal momento che, in studi prospettici, non è considerato etico permettere che una donna sviluppi una malattia invasiva per dimostrare l'efficacia preventiva, l'OMS ha deciso di considerare come endpoint clinico valido la presenza di lesioni considerate francamente precancerose (CIN 2/3).

Gli studi clinici randomizzati hanno dimostrato che la vaccinazione in tre dosi è efficace nel prevenire l'infezione persistente e le lesioni precancerose correlate. Il vaccino quadrivalente si è dimostrato efficace anche nel prevenire le lesioni condilomatose e le lesioni genitali precancerose (vulvari) da genotipi di HPV contenuti nel vaccino.

Gli studi sono stati condotti su donne giovani (<26 anni), con un numero medio di partner limitato (fino a 5-6), con anamnesi negativa per precedenti lesioni cervicali e negative per i tipi di HPV contenuti nel vaccino al momento dell'arruolamento.<sup>64</sup>

Comunque, ad oggi non ci sono sufficienti informazioni riguardo la durata dell'effetto protettivo dei vaccini e non si può escludere la necessità di dosi booster col passare degli anni dalla vaccinazione, anche se a 5 anni dall'immunizzazione l'efficacia protettiva sembra conservata.

È stato stimato che anche ipotizzando le migliori previsioni di copertura vaccinale, ci vorranno diversi decenni prima di riuscire ad abbattere il tasso di incidenza del cancro del collo dell'utero.

## Capitolo 5 - IL PROTOCOLLO DI SCREENING

Nel capitolo 3 sono state descritte le due tecniche diagnostiche utilizzate per lo screening di *primo livello*, ovvero il Pap test e/o l'HPV DNA test.

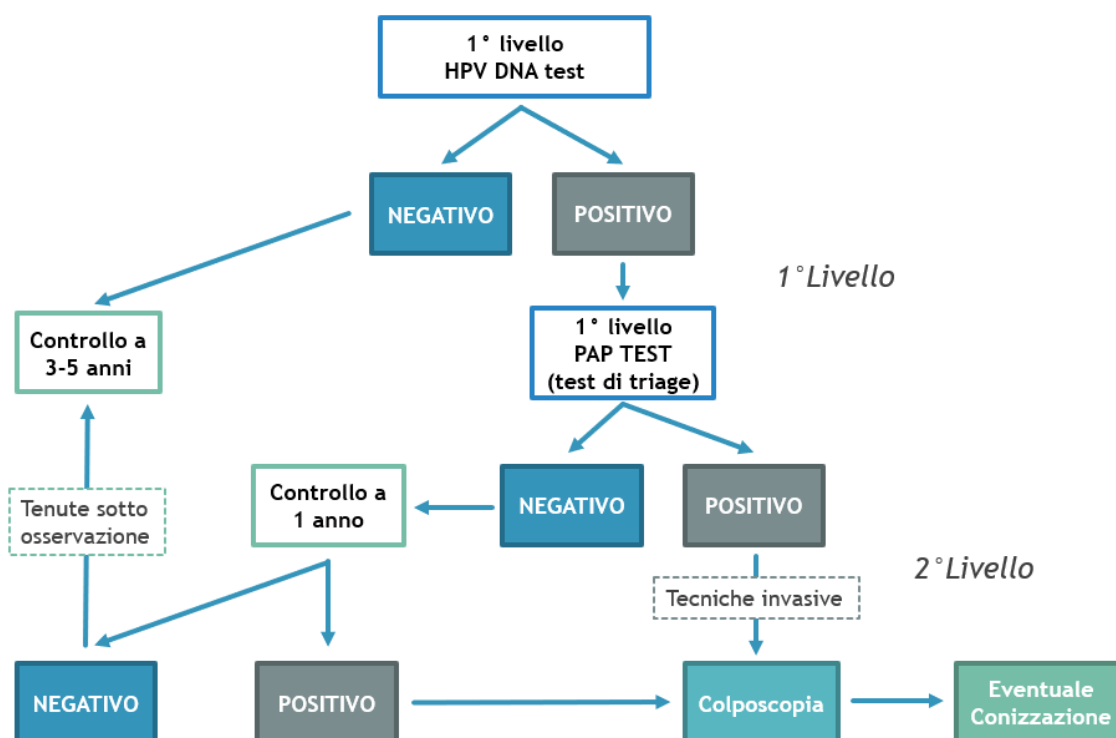


Fig. 15 - Schema del protocollo di screening

In caso di anomalie di risultato, la paziente dovrà sottoporsi ad indagini più approfondite ed invasive di *secondo livello*, quali l'indagine colposcopica con eventuale biopsia per l'analisi istologica a cui eventualmente può seguire la conizzazione, che porta all'esportazione chirurgica di una sezione conica di tessuto anomalo dal collo dell'utero.

Qualora, invece, gli esami di primo livello risultano negativi, la donna è tenuta sotto controllo nel tempo attraverso un protocollo di follow-up specifico, che prevede la ripetizione delle indagini di primo livello ad intervalli di tempo stabilito e a seconda dei casi.

La grossa criticità del protocollo di screening che è stata osservata con la pratica clinica è come si arriva alle indagini di secondo livello. Pap test ed HPV DNA test avviano alle successive procedure invasive e pertanto è necessario che *le analisi siano il più accurate possibili*.



Tuttavia, come descritto nel Capitolo 3, i limiti di queste indagini sono diverse. Il Pap test è fortemente dipendente dalla qualità del prelievo e può portare a numerosi falsi negativi; l'HPV-DNA test possiede una elevata sensibilità per il rilevamento di CIN2, CIN3 e del cancro cervicale, ma ha lo svantaggio di avere una bassa specificità rilevando anche le infezioni transitorie da HPV. Ciò si traduce in una *diagnosi eccessiva* e, di conseguenza, ad un *trattamento eccessivo* delle pazienti che vengono poi sottoposte a metodiche invasive non scevre da complicazioni e che per quanto siano conservative, un minimo di compromissione dell'area cervicale è presente.

Per questo motivo si può affermare che *il solo Pap test e/o HPV-test svolto nel primo livello non è sufficiente nel secondo livello*; da qui si dà l'avvio a procedure invasive anche quando potrebbe non essere necessario eseguirle perché la CIN non è ad alto rischio di progressione.

Allo stesso tempo, è ormai noto che *la sola analisi morfologica* (es. immunoistochimica) *non è sufficiente per una diagnosi finale accurata* e per determinare il destino delle lesioni. Questo aspetto è importante soprattutto perché la maggior parte delle lesioni CIN1 e CIN2, soprattutto nelle giovani donne, regrediscono spontaneamente e pertanto sarebbe un errore trattarle.

## OBIETTIVO

L'obiettivo di questo studio è quello di **migliorare la caratterizzazione delle lesioni al secondo livello attraverso analisi non morfologiche.**

È vero che l'infezione di HR-HPV persistente è un fattore 'necessario', ma *da sola non è sufficiente* per indurre la trasformazione neoplastica. Occorre la presenza di altri fattori favorevoli la persistenza dell'infezione da HPV e la carcinogenesi, detti cofattori.

*Si propone l'uso di un test molecolare* in grado di rilevare i cofattori capaci di influenzare l'andamento della lesione e, di conseguenza, capire il reale rischio di progressione della stessa per poter trattare in modo mirato *solo* le lesioni ad alto rischio di progressione.

I cofattori legati all'HPV di nostro interesse sono:

- **Genotipo virale**
- **Alta carica virale**
- **Infezione multipla, soprattutto con genotipi ad alto rischio (coinfezione)**
- **Status di integrazione virale**

*Ad oggi, questa procedura non è prevista nella pratica clinica.* Per questo si propone di implementare la diagnostica routinaria di un pannello di marcatori molecolari ed epigenetici che consentano di modulare il trattamento. Ciò permetterebbe di capire il reale rischio di progressione della lesione, di stabilire dei protocolli di screening e di follow up personalizzati e soprattutto di trattare con le metodiche di secondo livello solo le donne che ne hanno una reale necessità clinica. Le ricadute sono importanti sia per le pazienti stesse che economiche.

Non a caso gli strumenti di triage molecolari per il secondo livello, non basati sulla morfologia, sono di grande interesse per i futuri programmi di screening, non solo nella cervice uterina.

## *MATERIALI E METODI*

Tutti i campioni analizzati per questo studio derivano da pazienti arrivate all'osservazione presso il Policlinico San Martino (secondo livello) dopo aver svolto precedenti analisi di primo livello risultate anomale.

Ciascun campione è stato analizzato per:

- **Immunofenotipizzazione** mediante immunistochemica per **p16** e **ki67**
- **Genotipizzazione e determinazione della carica virale e di coinfezioni** attraverso la piattaforma multiplex real-time PCR, capace di rilevare, differenziare e quantizzare simultaneamente 28 distinti HPV (19 HR-HPV e 9 LR-HPV)

L'analisi morfologica e l'immunofenotipizzazione è stata eseguita presso l'U.O. Anatomia e Istologia Patologica seguendo il protocollo di analisi routinaria; mentre l'analisi molecolare sperimentale è stata messa a punto ed eseguita presso l'U.O. Igiene.

Entrambe le Unità Operative hanno lavorato in stretta collaborazione e fanno parte del Policlinico San Martino di Genova.

### *Scelta dei campioni*

Lo studio è stato svolto su un totale di 43 campioni cervicali (n° 53 analisi reali eseguite), 'in cieco', ovvero *non selezionate* precedentemente. Si è voluto simulare un utilizzo «real life» della procedura per capirne ancora meglio l'utilità e l'affidabilità che potrebbe avere nella clinica routinaria.

Il materiale analizzato è tutto di tipo FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded), di diversa tipologia di prelievo (curettage, biopsia, conizzazione, isterectomia).

Ad ogni paziente è stato richiesto il consenso informato scritto.

I campioni risalgono a donne analizzate nell'anno 2021 nell'intervallo di tempo tra gennaio e giugno nelle sopracitate strutture.

Essendo state selezionate prima dell'analisi morfologica e molecolare, ogni paziente preso in esame ha caratteristiche cliniche di varia natura. In particolare (Tab. 1):

<b>Caratteristiche generali della popolazione</b>	
<i>Parametri</i>	<i>N</i>
Pazienti	43
Analisi eseguite	53
<b>Età, anni</b>	
Media	41
Range	26-74
<b>Tipo di materiale</b>	
Biopsie/Curettage	37
Conizzazioni	12
Isterectomie	2
Non indicato	2
<b>Storico</b>	
ASC-H	3
ASCUS	2
CIN1	4
CIN2	3
CIN3	4
Condilomatosi	2
Ectropion	1
H-SIL	6
L-SIL	14
K	1
Polipo	2
Non indicato	1

Tab. 1 – Caratteristiche dei campioni analizzati in questo studio

## Flusso di lavoro

Ciascun prelievo viene inizialmente processato presso l'U.O. Anatomia Patologica seguendo le procedure standard di fissazione e inclusione in paraffina.

Una volta ottenuto il blocchetto di paraffina, ciascun campione è stato tagliato in doppio per poter eseguire da un lato l'analisi morfologica e l'immunofenotipizzazione tramite immunohistochimica (IHC) per la valutazione dell'espressione di p16 e del Ki-67; dall'altro per l'analisi molecolare delle lesioni per la determinazione del genotipo, carica virale e coinfezioni. Questa seconda parte è stata eseguita presso l'U.O. di Igiene (Fig. 16).

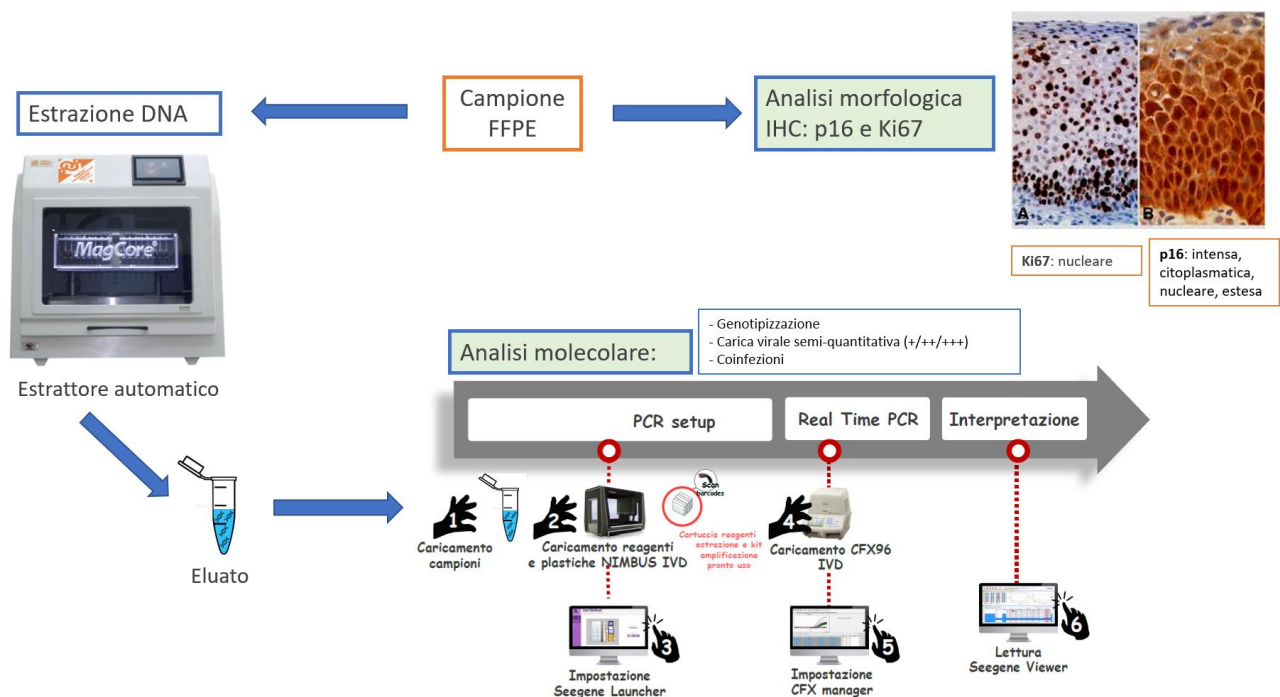


Fig. 16 – Schema del flusso di lavoro svolto per questo studio.

Per eseguire l'analisi molecolare, le sezioni FFPE vengono raccolte all'interno di una eppendorf in modo da poterle trasportare all'U.O. di Igiene. A questo punto, il materiale FFPE viene prima deparaffinato e lisato, poi si procede all'estrazione del DNA attraverso l'estrattore automatico MagCore™. L'eluato viene poi caricato su un altro strumento, NIMBUS (Seegene), che procederà all'analisi molecolare dei campioni allestendo una plate da 96-wells aliquotando nei pozzetti la PCR Mastermix e l'estratto dei campioni da analizzare.

La piastra completa viene sigillata con una pellicola e amplificata nel termociclatore CFX96™, collegato al NIMBUS e ad un sistema di computer. I dati ottenuti vengono analizzati nel Seegene Viewer che ne facilita l'interpretazione.

Di seguito vengono descritte più nel dettaglio le metodiche e gli strumenti utilizzati.

### *Immunoistochimica: cenni tecnici*

L'IHC costituisce un settore diagnostico che si affianca alle indagini morfologiche tradizionali per consentire, in molti casi, una più precisa definizione delle lesioni e una migliore conoscenza circa l'evoluzione delle stesse.

Il principio dell'IHC è il riconoscimento di un determinato *antigene*, localizzato sulle cellule in preparati istologici/citologici, attraverso l'utilizzo di un *anticorpo* specifico e sfruttando le caratteristiche delle reazioni immunologiche.

Molto sinteticamente, la definizione di queste due entità è la seguente:

- **ANTIGENE.** Sono molecole proteiche, lipoproteiche o glicoproteiche, in grado di evocare una risposta immune da parte del sistema immunitario. L'*epitopo o determinate antigenico* è quella porzione dell'antigene in grado di reagire con un anticorpo. In ogni antigene si riconoscono uno o più siti antigenici, ma ogni anticorpo si lega solo ad uno di questi;
- **ANTICORPO.** Sono molecole glicoproteiche prodotte dalle plasmacellule in grado di legarsi in modo specifico ai determinanti antigenici. Possono essere mono- o policlonali a seconda se siano tutti uguali e prodotti da un unico clone cellulare, oppure se siano una miscela di anticorpi geneticamente diversi.

I reagenti utilizzati nell'immunoistochimica comprendono:

- Un anticorpo policlonale o monoclonale
- Un *sistema di rivelazione*, che consiste in una sostanza legata all'anticorpo (fluorescente o enzimatica) in grado di produrre, mediante una reazione di ossido-riduzione, un precipitato che permetta di evidenziare al microscopio l'avvenuta reazione antigene-anticorpo nelle cellule o tessuti presi in esame.

La tecnica viene eseguita su sezioni di tessuto incluso in paraffina (FFPE).

L'antigenicità è influenzata dal processo di fissazione che forma legami peptidici mascherando i siti antigenici. Ci sono diverse tecniche che consentono di smascherare i siti antigenici coperti ed è comune l'utilizzo di enzimi proteolitici. Tali enzimi scindono i legami peptidici rendendo i siti antigenici nuovamente disponibili per il legame con l'anticorpo.

Gli enzimi che possono essere utilizzati sono tanti e ognuno, per poter svolgere la sua azione, necessita di un livello di temperatura, pH, tempi di incubazione caratteristici. Ogni laboratorio di immunoistochimica, quindi, deve disporre di un protocollo individuale di digestione enzimatica, conformato secondo le proprie modalità di fissazione e di allestimento dei campioni.

Il protocollo prevede:

1. Sparaffinatura e reidratazione del tessuto
2. Smascheramento dei siti antigenici
3. Incubazione con anticorpi
4. Montaggio dei vetrini

Rappresentando una tecnica di routine, ormai tutti i laboratori di Anatomia Patologica e, in generale, tutti quelli che svolgono reazioni IHC giornalmente, sono dotati di un immunocoloritore automatico in grado di svolgere in modo autonomo molte reazioni diverse contemporaneamente.

Sul mercato esistono vari tipi di immunocoloritori e quello utilizzato per lo svolgimento di questo studio è il *Ventana BenchMark XT* (Fig. 17).

Lo strumento è dotato di sostanzialmente tre moduli principali che lavorano insieme per automatizzare l'elaborazione della reazione desiderata:

- Colorazione
- Fluidica automatizzata
- Rifiuti



Ciascun modulo di questo sistema è perfettamente integrato con gli altri; ciò permette di automatizzare il lavoro e allo stesso tempo di avere una flessibilità delle colorazioni.

Il risultato è eccellente, veloce e ottenuto con la massima semplicità operativa, senza avere la necessità di molto personale dedicato.

Lo strumento possiede una sorta di “cassetto” rotante con 30 postazioni metalliche riscaldabili e indipendenti tra loro su cui vengono fatti aderire i vetrini consentendo di gestire 30 reazioni diverse contemporaneamente.

*Fig. 17 - Immunocoloritore automatico Ventana BenchMark XT*

Il vetrino, per poter essere riconosciuto dalla macchina, deve essere dotato di un'etichetta con codice a barre, che viene stampata tramite apposito strumento, corrispondente all'anticorpo da dispensare sul vetrino, nonché il nome o numero del paziente ed eventualmente la diluizione dell'anticorpo. Allo stesso modo gli anticorpi sono contenuti in siringhe di plastica, sempre etichettati con codice a barre, e posizionati in un carrello rotante posto sopra il cassetto dei vetrini, ma visibili dall'esterno.



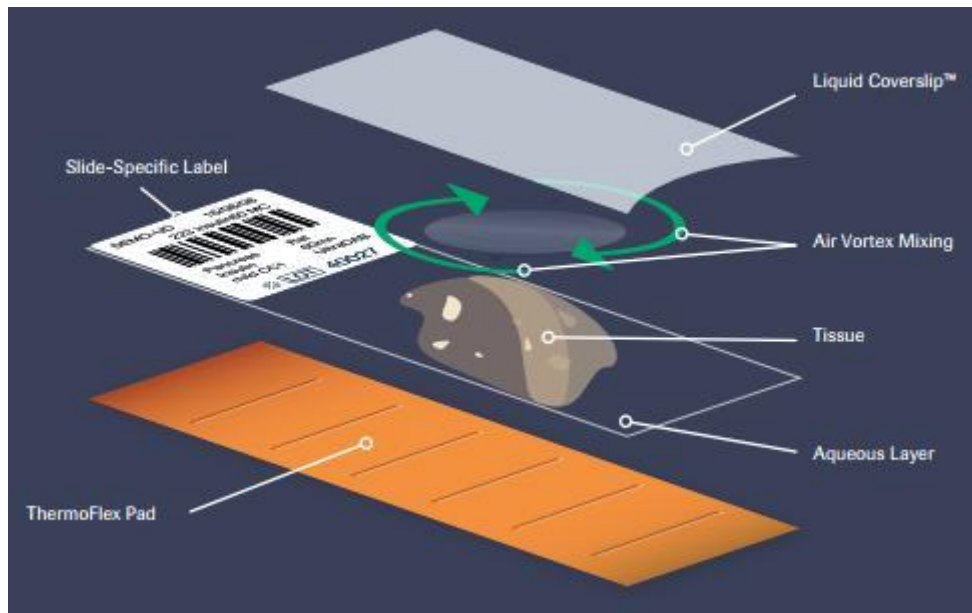


Fig. 18 - Rappresentazione grafica della tecnologia automatizzata

I vetrini e gli anticorpi inizialmente sono letti e riconosciuti dalla macchina attraverso un sensore ottico e poi si muovono, ruotando, in modo indipendente in base alle necessità. Sopra ciascun vetrino ci sono ugelli che dispensano i liquidi e gli anticorpi in modo preciso; inoltre, un sistema ad aria crea una sorta di vortice permettendo di mescolare tra loro i vari reagenti garantendo una cinetica di reazione uniforme su tutta la superficie del vetrino (Fig. 18).

Alla fine della reazione, un sottile strato acquoso ricopre il vetrino lasciando il tessuto idratato ed integro. Questo è molto importante nella routine diagnostica, specie di un centro Ospedaliero, dove solitamente queste macchine rimangono attive anche di notte; se non ci fosse questo sistema, al mattino successivo si avrebbero i tessuti completamente asciutti e inutilizzabili.

### *IHC: Protocolli utilizzati*

I campioni cervicali FFPE, vengono tagliati ad uno spessore di 2  $\mu\text{m}$  per poi essere processati nell'immunocoloritore automatico *Ventana BenchMark XT* (Ventana Medical Systems) secondo il protocollo prestabilito.

Le sezioni vengono asciugate a 37 °C per 1 ora e deparaffinati utilizzando EZ Prep (Ventana Medical Systems) a 75 °C per 4 minuti. A questo punto i campioni subiscono un pretrattamento utilizzando CC1 (Ventana Medical Systems) a 95 °C per 8 minuti.

A questo punto si può procedere all'incubazione con gli anticorpi:

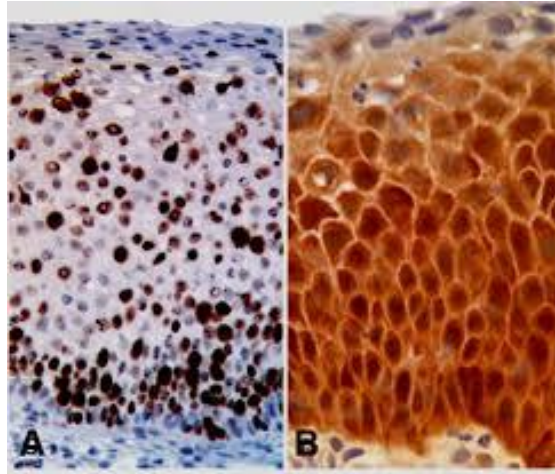
- *Protocollo per p16*: l'incubazione con l'anticorpo anti-p16 (monoclonal antibody E6H4, Roche), prediluito, che avviene a 37 °C per 20 minuti.
- *Protocollo per Ki67*: l'incubazione con l'anticorpo anti-Ki67 (Rabbit Anti-Human Ki-67 Monoclonal Antibody Clone SP6, Roche), prediluito, che avviene a 37 °C per 16 minuti.

Il sistema di rivelazione utilizzato è ultra-viewUniversal DAB Detection kit (Ventana Medical Systems) basato sul sistema polimerico biotina-free, un sistema indiretto privo di biotina, particolarmente sensibile, costituito da un cocktail di anticorpi secondari marcati con enzima.

Come contrasto è stata utilizzata l'Ematossilina di Gill's modificata (Ventana Medical Systems) per 8 minuti a temperatura ambiente, seguita da 4 minuti di Bluing-reagent (Ventana Medical Systems), una soluzione che aumenta il contrasto dell'ematossilina verso una colorazione azzurro-scuro, blu.

Una volta terminata la reazione, i vetrini vengono montati manualmente con Eukitt.

La reazione immunohistochimica mette in evidenza: la proteina di p16, che ha un pattern di espressione intensa, citoplasmatica, nucleare ed estesa; e il KI-67, ovvero l'indice di proliferazione cellulare, che ha un'espressione nucleare andando a legarsi alle cellule in attiva replicazione (Fig. 19).



*Fig. 19 – Immagine IHC dell'espressione di KI67 (sinistra) e di p16 (destra)*

### *Estrazione del DNA: cenni tecnici*

Il primo passo per procedere alle tecniche di biologia molecolare consiste nell'isolamento e nella purificazione degli acidi nucleici, sia del DNA che dell'RNA. Il DNA genomico è presente in tutte le cellule nucleate e può essere isolato dal sangue intero, da materiale citologico e da tessuti a fresco oppure di tipo FFPE. Esistono varie tecniche di estrazione del DNA che spaziano dalla classica estrazione mediante fenolo-cloroformio fino all'utilizzo di svariati kit commerciali che velocizzano e facilitano la procedura. Al di là della tecnica applicata, l'obiettivo principale del procedimento di estrazione è ottenere un *buon quantitativo* di acido nucleico caratterizzato da un *elevato grado di purezza*, quindi privo di contaminazioni, al fine di agevolare le successive tecniche di studio e analisi. Il DNA viene definito di alta qualità quando è di alto peso molecolare ed è relativamente libero dalla contaminazione di proteine o di RNA. La purezza del DNA viene accertata con il rapporto tra la sua densità ottica (DO) a 260 nm rispetto a quella rilevabile a 280 nm, con un rapporto di DO 260/280 per il DNA puro di 1,8. Un rapporto più basso (<1,6) indica che il DNA è contaminato da proteine o da materiali utilizzati nella procedura di isolamento ed un rapporto più alto (>2,0) indica che il DNA è contaminato dall'RNA. I kit commerciali per l'isolamento del DNA hanno di solito una resa di 15 µg di DNA per ogni millilitro di sangue intero processato.

Per questo studio è stato utilizzato un kit di estrazione che permette la purificazione del DNA da tessuti FFPE utilizzando l'estrattore automatico di acidi nucleici MagCore® (Fig. 20).



Fig. 20 – Estrattore automatico MagCore™ (sinistra); schema delle cartucce che vengono caricate sull'estrattore (destra). Sono allungate e organizzate in piccoli pozzetti, ognuno contenente una soluzione diversa. Durante la procedura di estrazione, lo strumento fora la pellicola che ricopre la cartuccia e, tramite l'apposito puntale, utilizza il contenuto dei vari pozzetti a seconda del protocollo di estrazione.

Il metodo è caratterizzato da un riscaldamento One-Step, per sciogliere la paraffina senza l'utilizzo di sostanze pericolose come lo xylene, ma bensì si utilizza una soluzione di deparaffinazione proprietaria chiamata "sula oil". Il DNA viene estratto in modo veloce ed economico attraverso biglie magnetiche rivestite di cellulosa.

Lo strumento è dotato di uno sportello e di un supporto metallico tipo griglia in cui incastrare delle cartucce contenenti tutto il necessario per eseguire l'estrazione automatica. Allo strumento, oltre alla cartuccia, occorre aggiungere un puntale, un'eppendorf per raccogliere l'eluato. Precedentemente, il campione FFPE è stato inserito nel primo pozzetto vuoto della cartuccia insieme alla soluzione di sparaffinatura e alla proteinasi K. Una volta acceso e allestito del necessario, lo strumento viene avviato utilizzando un display touch screen posto sullo sportello.

Il kit prevede l'uso di due protocolli in funzione della dimensione del campione: 2 ore per campioni piccoli, 16 ore per campioni grandi.

Questa metodica prevede che la fase di sparaffinatura e di lisi avvengano contemporaneamente e a caldo. La *fase di lisi* porta a degradare il tessuto o le cellule di partenza in modo da versare esternamente il contenuto intracellulare. Tuttavia, questa fase non deve causare la frammentazione degli acidi nucleici. La lisi può essere di varie tipologie: meccanica, chimica ed enzimatica, come in questo caso.

Dopo la fase di sparaffinatura e lisi automatica, si procede con l'estrazione mediante *sfere magnetiche* rivestite di cellulosa. Le particelle magnetiche agiscono come fase solida attorno alla quale si lega l'acido nucleico (Fig 21).

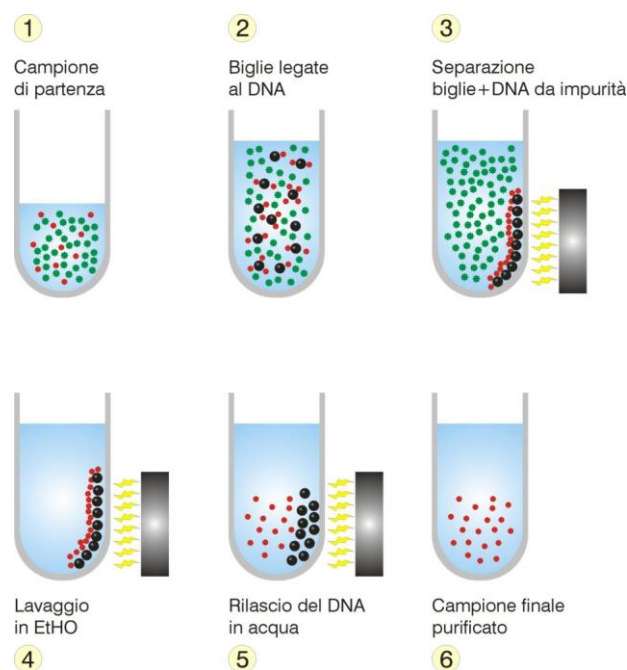


Fig. 21- Procedura di estrazione del DNA mediante sfere magnetiche rivestite di cellulosa

Il sistema di estrazione, dopo la sparaffinatura e la lisi, prevede il trasferimento della sospensione ottenuta in colonnine contenenti delle piccole sfere magnetiche rivestite con cellulosa. La cellulosa permette il legame dell'acido nucleico alle sfere.

In seguito, si attiva una *piastra magnetica* che attira e trattiene le biglie caricate con il DNA sul fondo della colonna. Questo passaggio permette un'agevole aspirazione del surnatante contenente i contaminanti da scartare. Successivamente, le biglie vengono sottoposte a vari lavaggi per eliminare ulteriori contaminanti. Infine, il magnete viene allontanato e l'acido nucleico viene eluito con acqua, per essere purificato e separato dalle sfere che restano all'interno della colonnina.

La precisione del metodo estrattivo è sicuramente influenzata dalla qualità e dalla quantità del campione di partenza. Sicuramente i materiali FFPE sono difficili da estrarre con una buona resa. Infatti, questo tipo di conservazione tissutale danneggia la quantità e la qualità del DNA in quanto ne causa la frammentazione. La formalina è il fissativo per eccellenza, però frammenta il DNA. Tuttavia, grazie alle attuali procedure automatiche, la procedura migliora notevolmente la sua resa; inoltre, per la maggioranza dei kit commerciali di analisi molecolare basta un quantitativo basso di DNA per riuscire ugualmente nella procedura di analisi e spesso non è necessario nemmeno quantizzarlo all'inizio della metodica.

### *Real time: cenni tecnici*

Lo sviluppo delle moderne tecniche molecolari ha espanso enormemente le nostre conoscenze su tutti i sistemi biologici. Queste stesse tecniche sono applicabili nella diagnostica delle malattie, nell'esercizio della scienza forense, nella generazione di proteine ricombinanti e nella produzione di geni funzionali per la terapia genica.

La *reazione a catena della polimerasi (PCR)* ha rivoluzionato la genetica molecolare perché ha permesso di analizzare velocemente il DNA.

La PCR permette l'amplificazione rapida e selettiva di una specifica sequenza bersaglio in un campione eterogeneo di sequenze. La PCR può amplificare, per milioni di volte, una singola copia della sequenza del DNA in esame, purché almeno un frammento della sequenza nucleotidica sia noto. Infatti, per ottenere un'amplificazione selettiva è necessario prima conoscere la sequenza di DNA bersaglio in modo da poter costruire i *primer*, ovvero piccole sequenze nucleotidiche utilizzate come inneschi e solitamente lunghi dai 18 alle 25 nucleotidi. Sono necessari due primer: *primer forward* (5') ed un *primer reverse* (3'). Questi sono disegnati in modo che ciascuno sia complementare ad ogni filamento di DNA e che, insieme, fiancheggiino la regione di interesse.

I *primer* possono essere progettati in modo da aggiungere una marcatura al prodotto della PCR rendendo più facile il riconoscimento. La marcatura può essere di varia natura, ma la più frequente è quella fluorescente. La reazione di PCR viene catalizzata da una *Taq polimerasi* di derivazione batterica (*Thermus aquaticus*), stabile al calore fino a 94 °C, con un optimum di resa ad 80 °C e dotate di attività esonucleasica 3' → 5'. La termostabilità di questi enzimi ne permette la resistenza ai cicli ripetuti di riscaldamento e raffreddamento.

La tecnica di amplificazione è semplice e richiede una quantità molto piccola di DNA (di solito <100 ng di DNA genomico). Il DNA in esame viene miscelato insieme a una soluzione tampone, a nucleotidi in eccesso, ai primer e alla Taq polimerasi. La miscela di reazione viene posta in un termociclature programmato per produrre una serie di cicli di riscaldamento e raffreddamento che determinano un'amplificazione esponenziale del DNA.

I numerosi cicli sequenziali sono costituiti da tre reazioni:

- *Denaturazione*. Il DNA bersaglio viene inizialmente denaturato con il riscaldamento della miscela fino a 93-95 °C, in modo tale che il doppio filamento di DNA si separi in filamenti singoli;
- *Annealing* (appaiamento dei primer). Il successivo raffreddamento, in presenza di quantità in eccesso di *primer* a singolo filamento, sia senso che antisenso, consente a questi di appaiarsi alle sequenze complementari presenti sul filamento singolo del DNA matrice. La temperatura di raffreddamento viene calcolata in funzione dei *primer* utilizzati e solitamente è compresa tra 50-70 °C.
- *Allungamento* (sintesi di DNA). La miscela di reazione viene poi riscaldata alla temperatura ottimale per la Taq polimerasi, in genere a circa 70-75 °C. Si genera un nuovo filamento di DNA su ogni singolo filamento di DNA stampo, utilizzando i nucleotidi come mattoni da costruzione per realizzare l'allungamento del DNA.

I cicli si ripetono numerose volte. Ogni nuovo ciclo denatura nuovamente i doppi filamenti neoformati e le copie di DNA a singolo filamento serviranno, a loro volta, come modello per le successive sintesi. Il numero di copie di DNA raddoppia ad ogni ciclo in modo che, dopo 20 cicli, vi è un'amplificazione di miliardi di volte del DNA bersaglio.

Sono state sviluppate delle varianti della PCR per soddisfare necessità specifiche.

Prima fra tutti è la *Real-time PCR*, che permette la simultanea amplificazione e quantizzazione della sequenza bersaglio. Amplifica seguendo essenzialmente gli step di una classica PCR, mentre la quantizzazione è permessa perché si aggiungono dei composti la cui fluorescenza emessa ad ogni ciclo di reazione è proporzionale alla quantità di amplificato.



Si utilizza un termociclatore in grado di rilevare la fluorescenza, solitamente prodotta secondo il principio del Quencher-Reporter. Ovvero, si utilizzano delle sonde (probe) marcate con un Quencher e un Reporter: finché i due stanno vicini la fluorescenza è inibita, quando la reazione procede, l'attività esonucleasica della Taq li separa e permette al Reporter di emettere fluorescenza. Questa viene rilevata dallo strumento che produce una curva che aumenta man mano che si produce amplificato (Fig. 22).

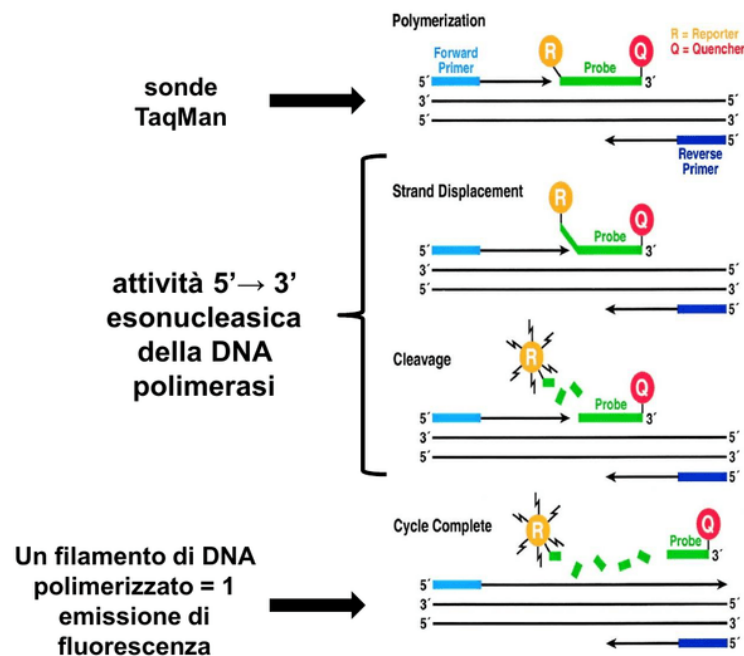


Fig. 22 – Schema di reazione del metodo Quencher-Reporter di una Real-time PCR

La metodica, quindi, permette di misurare l'amplificazione "in tempo reale" durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale "end point".

Altre varianti della PCR comprendono la *PCR multiplex*, come quella utilizzata in questo studio. In questo caso segmenti multipli ed indipendenti di DNA vengono contemporaneamente amplificati e quantizzati nella stessa reazione sempre seguendo il principio della Real-time.

### *Analisi molecolare: cenni tecnici*

Per l'analisi molecolare è stato utilizzato lo strumento NIMBUS (Seegene), associato al termociclatore CFX96™ e ad un pc con il software Seegene Viewer per l'elaborazione dei dati (Fig. 23).



Fig. 23 – Immagini dello strumento NIMBUS, seguito dal termociclatore CFX96™ e da un pc con il software Seegene Viewer

Il NIMBUS è un estrattore automatico ed è in grado di allestire piastre da 96-wells per la successiva amplificazione. Al suo interno contiene un supporto per i reagenti, per le piastre, per i puntali e un cestino. È dotato di un braccio meccanico che si muove seguendo un protocollo specifico precedentemente stabilito tramite il PC collegato.

Per questo studio è stato utilizzato il kit Anyplex™ II HPV28 Detection (Seegene), normalmente utilizzato nell'analisi routinaria per la rilevazione di HPV in campioni citologici. Per questo studio, invece, è stato testato in via sperimentale sugli eluati provenienti dal materiale FFPE estratti precedentemente con la metodica già descritta.

Il kit consiste in due reazioni PCR (set A e set B). Ogni set consiste in una PCR multiplex che permette la simultanea amplificazione del DNA di 14 HR-HPV e di 5 HR-HPV e 9 LR-HPV rispettivamente (Fig. 24).

Category	Types
A set	14 high-risk HPV types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
B set	5 high-risk HPV types (26, 53, 69, 73, 82) 9 low-risk HPV types (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70)

Fig. 24 – Genotipi rilevati dal kit

È una tecnologia che riesce a rilevare più ceppi di HPV in un singolo canale di fluorescenza basati su tecnologia della PCR Real-time. Ciò consente di identificare il *genotipo* di HPV infettante e di rilevare l'eventuale *coinfezione* di più ceppi in uno stesso campione.

Il kit è costituito da due primer, una mix contenente DNA polimerasi e i dNTPs, tre controlli positivi e l'acqua.

Lo strumento NIMBUS prepara la PCR Mastermix in base ai campioni che ha caricato al suo interno, che poi dispensa sulla piastra da 96-wells distribuendone 15 µl per pozzetto. Successivamente, dispensa 5 µl di campione, che nel nostro caso è l'eluato derivante dal materiale FFPE precedentemente estratto. Per un totale di 20 µl per pozzetto.

Una volta preparata la plate con la PCR Mastermix e i campioni, si sigilla con una pellicola e si pone all'interno del termociclatore CFX96™ associato allo strumento e si avvia la procedura di amplificazione. Il profilo termico seguito è descritto in Figura 25. Il protocollo ha una durata di circa 4 ore e si può seguire nel tempo osservando il display del termociclatore (Fig 26).

i) cyclic-CMTA (Melt analysis of three times)

Step	Temperature	Duration	No. of cycles
1	50°C	4 min	
2	95°C	15 min	
3	95°C	30 sec	30
4	60°C	1 min	
5	72°C	30 sec	
6	GOTO 3, 29 more times		
7	55°C	30 sec	
8*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		
9	95°C	30 sec	10
10	60°C	1 min	
11	72°C	30 sec	
12	GOTO 9, 9 more times		
13	55°C	30 sec	
14*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		
15	95°C	30 sec	10
16	60°C	1 min	
17	72°C	30 sec	
18	GOTO 15, 9 more times		
19	55°C	30 sec	
20*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		

\*Note: Plate Read at Steps 8, 14 and 20. Fluorescence is detected at Melting.

Fig. 25 – Profilo termico utilizzato

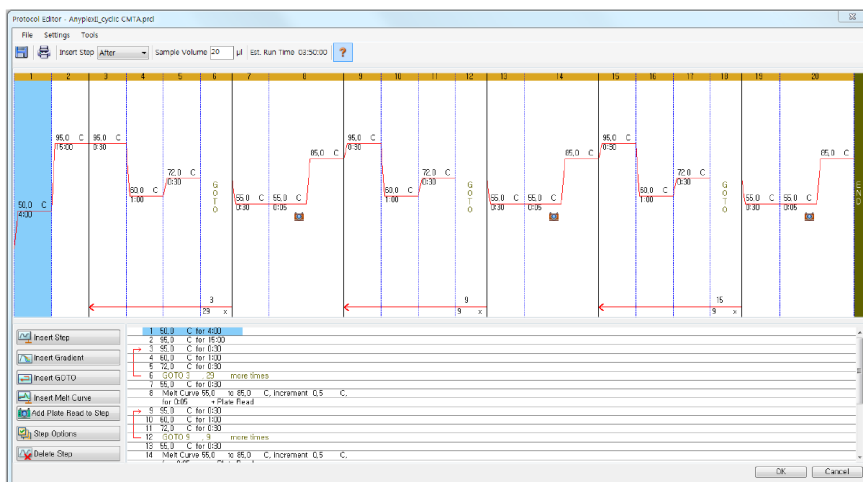
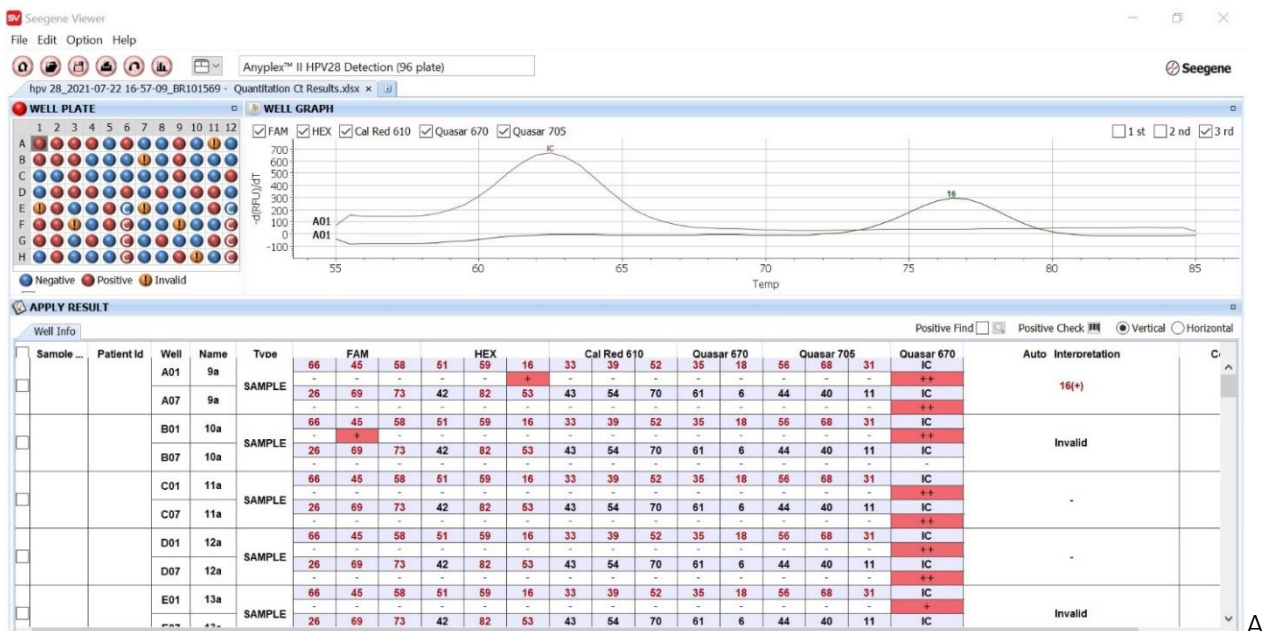


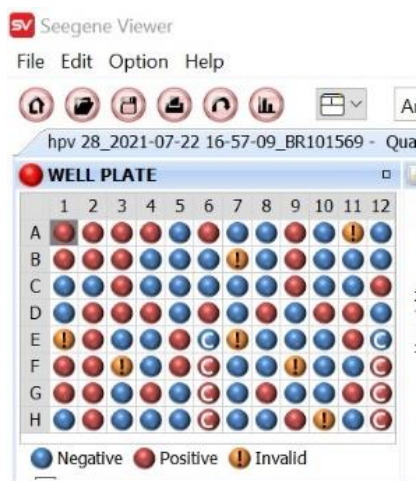
Fig. 26 – Immagine del profilo termico visibile sullo strumento, con le indicazioni di temperatura e dei cicli

La rilevazione della *carica virale* è semiquantitativa. In particolare, il profilo termico prevede tre rilevazioni della fluorescenza in corrispondenza delle tre temperature di Melting, ovvero in corrispondenza degli steps 8, 14 e 20. Se la fluorescenza relativa a quel genotipo è rilevata tutte e tre le volte, quel ceppo avrà una carica semiquantitativa pari a +++; allo stesso modo, se viene rilevata solo due volte sarà di ++; una volta sola sarà di +.

Una volta terminata la procedura di amplificazione, si esportano i dati nel Seegene Viewer, che ne facilita l'interpretazione (Fig. 27-A). La schermata ottenuta mostra la plate sottoforma di pallini il cui colore indica se il campione è positivo (rosso), negativo (azzurro) o invalido (arancione). Selezionando ciascun pozzetto, sulla destra viene mostrato il grafico relativo a quel campione (Fig. 27-B). Nella parte sottostante, è riportata una tabella esportabile in PDF con tutti i risultati ottenuti da cui è possibile capire per ogni campione il genotipo infettante, la presenza di coinfezioni e la carica virale (Fig. 27-C).



A.



B.

Well	Name	Tvde	FAM	HEX	Cal Red 610	Quasar 670	Quasar 705	Quasar 670	Auto Interpretation
A01	9a	SAMPLE	66 45 58 51 59 16 33 39 52 35 18 56 68 31	IC	16(+)				
A07	9a	SAMPLE	26 69 73 42 82 53 43 54 70 61 6 44 40 11	IC					
B01	10a	SAMPLE	66 45 58 51 59 16 33 39 52 35 18 56 68 31	IC					
B07	10a	SAMPLE	26 69 73 42 82 53 43 54 70 61 6 44 40 11	IC	Invalid				
C01	11a	SAMPLE	66 45 58 51 59 16 33 39 52 35 18 56 68 31	IC					
C07	11a	SAMPLE	26 69 73 42 82 53 43 54 70 61 6 44 40 11	IC					

C.

Fig. 27 – Esempio di schermata del Seegene Viewer.

- A. Immagine complessiva
- B. Dettaglio di come viene mostrata la plate con i pozzetti colorati in modo diverso a seconda del risultato: positivi (rossi), negativi (blu), invalidi (arancioni)
- C. Tabella dove vengono riportati i risultati dettagliati, con indicazione di genotipo, carica virale e coinfezioni per ciascun sample analizzato

## RISULTATI

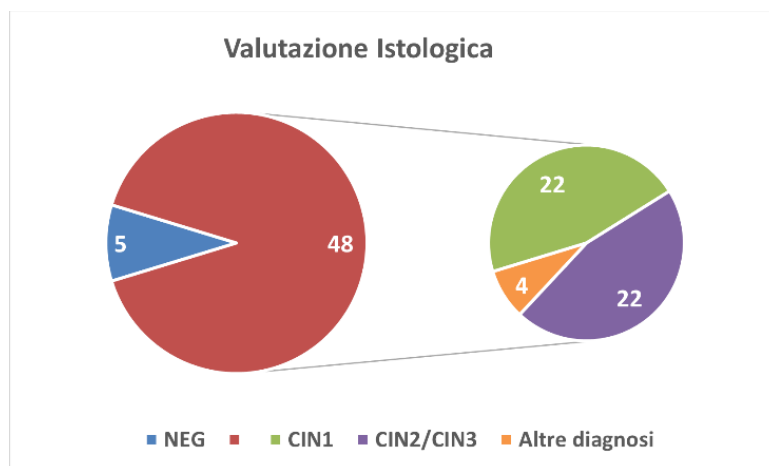
Come specificato inizialmente, i campioni analizzati per questo studio sono stati scelti "in cieco", ovvero senza averli analizzati precedentemente. Si è cercato di simulare un uso "real life", ovvero come se la procedura di analisi morfologica e molecolare fossero normalmente utilizzate insieme per l'analisi di routine.

### Diagnosi istologica

L'analisi morfologica dei campioni ha rilevato:

- N° 5 casi NEGATIVI
- N° 48 casi POSITIVI, di cui
  - N° 22 CIN 1
  - N° 22 CIN 2/CIN 3
  - N° 4 altre diagnosi (L-SIL, cancro, condilomatosi)

<i>Diagnosi istologica</i>		<i>N°</i>
Neg		5
CIN1	LH-SIL (p16 - Ki67 < 1/3)	22
CIN2/CIN3	H-SIL (p16 - Ki67 ≥ 2/3)	22
Cancro		1
L-SIL		2
Condilomatosi		1

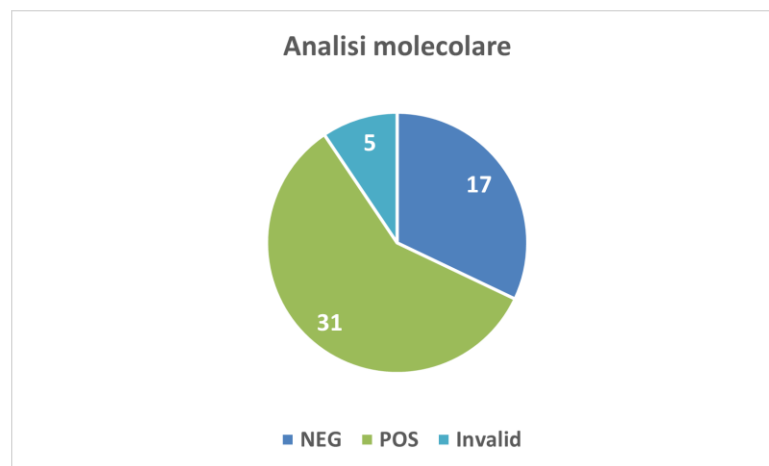


## Analisi molecolare

L'analisi molecolare dei campioni ha rilevato:

- N° 17 casi NEGATIVI
- N° 31 casi POSITIVI
- N° 5 casi INVALIDI: 5 (tutti curettage)

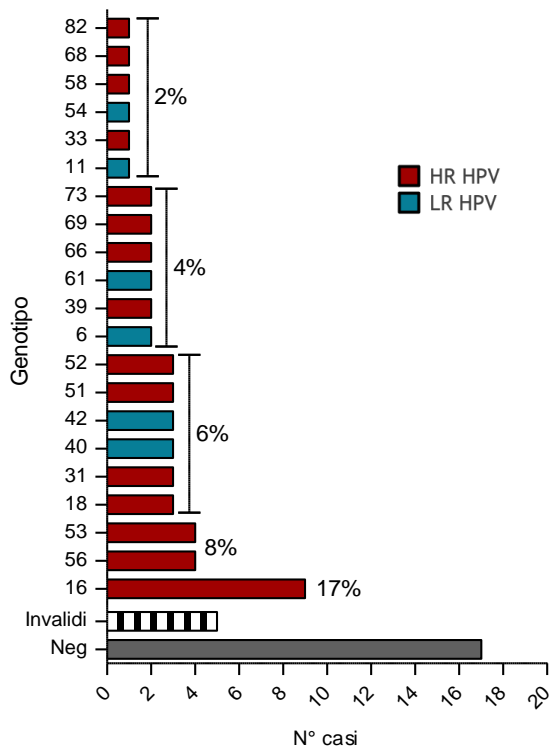
<i>Risultato analisi molecolare</i>		<i>N°</i>
Neg		17
Pos		31
Invalidi		5
N° ceppi rilevati		22
HR HPV		16
LR HPV		6
Carica semiquantitativa	debole (+)	23
	media (++)	25
	alta (+++)	4



Si precisa che i casi invalidi sono dovuti alla scarsità del materiale di partenza e non a criticità della metodica.

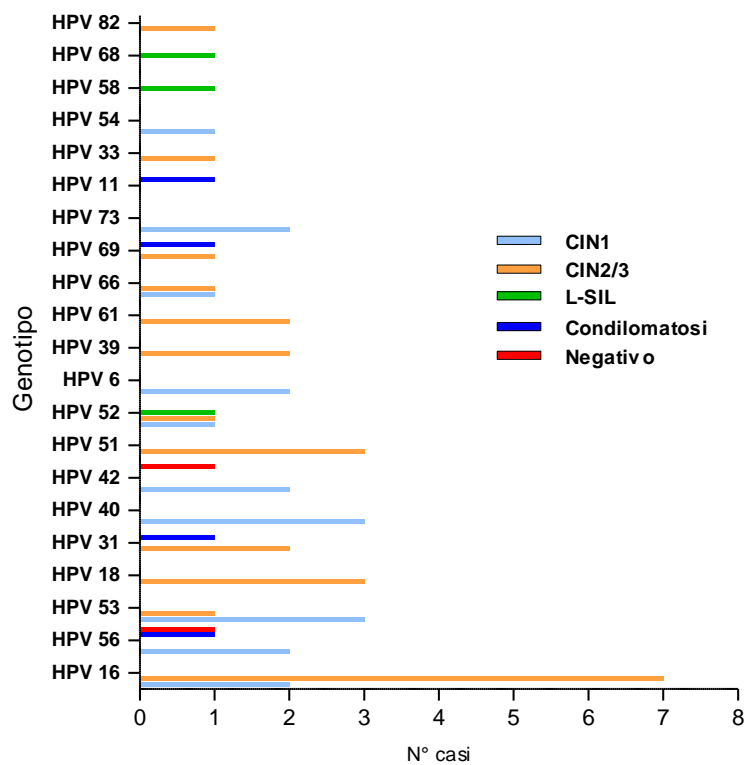
### Correlazione tra istologia e genotipi

Nei grafici sottostanti si è voluto mettere in relazione i genotipi infettanti e l'istologia della lesione cervicale derivante dall'infezione e il numero dei casi in cui sono stati rilevati.



Nella figura si raggruppano i genotipi per il numero di casi in cui sono stati rilevati ed evidenziando se sono ad alto rischio (rosso) o a basso rischio (blu). Il genotipo rilevato più abbondante è HPV16, che si conferma essere il più diffuso nel territorio; seguito da HPV56 e HPV53, che, invece, sono meno diffusi nella popolazione dal punto di vista epidemiologico.





In questo istogramma si mette in evidenza a quale tipo istologico è associato ogni genotipo di HPV rilevato e il numero dei casi relativi. Il ceppo più frequente HPV 16 è associato soprattutto a lesioni di alto grado CIN2/CIN3, confermando ciò che viene riportato in numerosi studi in letteratura.

## Coinfezioni, genotipi e carica virale

Le considerazioni più importanti a livello clinico che fanno capire realmente l'importanza dell'indagine molecolare, si fanno quando si considerano i tre cofattori di nostro interesse, ovvero il genotipo, le coinfezioni e la carica virale.

Innanzitutto, due considerazioni:

- In caso di coinfezione le pazienti hanno andamento di malattia tumultuoso;
- Genotipi e carica virale: in presenza di HR-HPV e carica virale elevata, la prognosi peggiora

**Genotipi**

Parametri		N
N° ceppi rilevati		22
HR HPV		16
LR HPV		6
Istologia dei HR HPV	CIN1	8
	CIN2/CIN3	18
	L-SIL	2
	Condilomatosi	1
	Negativo	1
Istologia dei LR HPV	CIN1	3
	CIN2	2
	Condilomatosi	1
	Negativo	1

**Coinfezioni e carica virale**

N° casi	Analisi istologica	Risultato molecolare	
		HR HPV	LR HPV
1	CIN1	52+, 56+, 73+	42++, 6++, 40++
2	CIN1	56+, 73+	42++, 6+++, 40++
3	CIN1	66+	54+++, 40+++
4	CIN2	39++, 31+	61+
5	CIN2	51+, 53++	
6	CIN2	39++, 31+	61+
7	CIN3	66+++, 16++	
8	CIN3	51+++, 18+	
9	Condiloma	56+, 31+, 69+	11+++
10	L-SIL	52+, 68++	

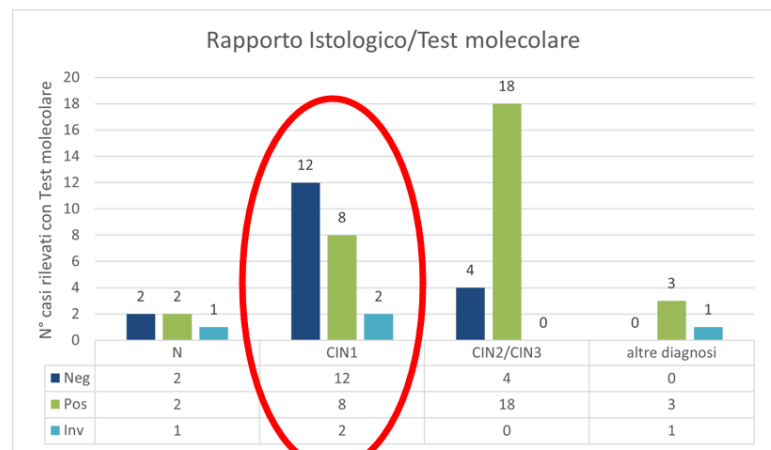
Nella tabella di sinistra si mettono in relazione la natura istologica della lesione e se il genotipo è ad alto o a basso rischio; mentre nella tabella di destra sono stati raggruppati solo i casi che presentano coinfezioni e la carica virale, con indicazione della diagnosi istologica.

Si evidenzia che i casi con il maggior numero di coinfezioni hanno una diagnosi istologica di CIN1, ovvero di basso grado e, a livello teorico, a basso rischio di progressione. Così come ci sono ben 8 casi di CIN1 infettati da ceppi ad alto rischio.

## Istologia VS test molecolare

Nell'istogramma sottostante sono messi in relazione la diagnosi istologica e l'indagine molecolare, soprattutto per quanto riguarda il numero di casi considerati "positivi" o "negativi".

Rapporto Istologico/Test molecolare		
Istologico	Test Molecolare	
Neg	Neg	2
	Pos	2
	Invalid	1
CIN1	Neg	12
	Pos	8
	Invalid	2
CIN2/CIN3	Neg	4
	Pos	18
	Invalid	0
Cancro	Neg	0
	Pos	0
	Invalid	1
L-SIL	Neg	0
	Pos	2
	Invalid	0
Condilomatosi	Neg	0
	Pos	1
	Invalid	0



L'aspetto che colpisce maggiormente riguarda i casi "positivi di tipo CIN1": l'istologia ha evidenziato n° 22 (12+8+2) lesioni di basso grado, mentre il test molecolare ne ha rilevato solo n° 8 (in verde). Pertanto, quasi 2/3 dei casi analizzati sono risultati negativi al test molecolare.

Questo aspetto mette in evidenza la forte criticità di cui si discuteva nei capitoli introduttivi, ovvero che *con la sola analisi morfologica probabilmente non si riesce a discriminare le CIN1 reali dagli stati di flogosi* e ciò porta a sovrastimare il numero di lesioni HPV-relate.

## CONCLUSIONE

Le lesioni neoplastiche e preneoplastiche della cervice uterina rappresenta un rilevante problema socio-sanitario, ancora troppe donne giungono all'osservazione con lesioni avanzate che richiedono trattamenti invasivi. L'analisi morfologica ha scarsa sensibilità e variabilità. Solo l'integrazione con dati molecolari consentirebbe una maggiore robustezza diagnostica, una personalizzazione del trattamento farmacologico e di follow up.

I dati presentati mostrano che la diagnosi istologica del pool analizzato è per 22/55 casi CIN1 e di questi l'analisi molecolare evidenzia 12/22 casi negativi, ovvero il 54% dei CIN1 in realtà non sono lesioni HPV-relate. Pertanto, si conferma che *con la sola analisi morfologica si tende a sovrastimare le CIN1*. Questa criticità, però, ha notevoli conseguenze in primis per le pazienti, che vanno incontro ad ulteriori accertamenti diagnostici o addirittura a metodiche invasive quando, invece, non sarebbero da trattare; ma anche economiche per il SSN.

Inoltre, 10 casi di CIN1 sono coinfectati e con cariche virali alte, ovvero sono a maggior rischio di progressione neoplastica e andrebbero strettamente monitorati nel tempo. Pertanto, dal punto di vista teorico, i casi CIN1 sono a basso rischio di progressione; tuttavia, senza un'indagine molecolare che permette di conoscere quali genotipi causano la lesione e l'entità della carica virale, ciò rimane un discorso puramente teorico. Infatti, non tutti i casi di CIN1 rilevati in questo studio presentano lo stesso rischio di progressione neoplastica. *I casi che richiedono maggiore attenzione sono gli L-SIL infettati con HR HPV e i coinfectati*. Senza un'analisi molecolare, però, queste caratteristiche della lesione rimangono sconosciute e si rischia di sottostimare lesioni che, se pur a basso rischio, hanno più probabilità di trasformarsi in neoplasia.

È evidente, quindi, che *l'analisi molecolare può migliorare la diagnosi e consente di stabilire un protocollo terapeutico e di follow-up personalizzato*.

L'analisi molecolare delle lesioni avrebbe un'utilità anche da un punto di vista epidemiologico, in quanto permetterebbe di mappare sul territorio i genotipi infettanti. In questa esperienza, ad esempio, sono stati ritrovati genotipi come HPV56 e HPV53, meno diffusi a livello europeo rispetto ad altri, ma che sembrano aumentare sempre di più nel recente periodo. Probabilmente tra le cause potrebbe esserci l'effetto della vaccinazione anti-HPV, che non coprendo questi due genotipi, ne determina indirettamente una maggiore diffusione in quanto permette loro di prendere il sopravvento sugli altri.

Si conclude affermando innanzitutto che l'esperienza acquisita con la cervice uterina verrà estesa agli altri distretti anatomici colpiti da patologia HPV-relata.

Inoltre, *occorre affinare le procedure diagnostiche nel secondo livello* in modo da inviare a conizzazione solo le pazienti che ne hanno reale bisogno; mentre per tutte le altre pazienti basta seguire l'evoluzione della lesione nel tempo, dato che molte di queste, soprattutto se di basso grado, tendono a regredire spontaneamente.

## *OBIETTIVI FUTURI*

Una volta compresa la criticità principale della diagnosi delle lesioni HPV-relate, soprattutto per quelle di basso grado, quali azioni si potrebbero mettere in atto per migliorare la procedura diagnostica?

- **Introduzione di un test molecolare nella pratica routinaria.** Il kit utilizzato per le nostre analisi, pur avendo il marchio CE-IVD validato solo su materiale citologico (tampone vaginale), si è dimostrato robusto (e sensibile) anche su materiale FFPE;
- **IHC:** oltre alla p16 e al Ki-67, si potrebbero aggiungere la valutazione di *L1*, utile nei bassi gradi e la *ISH* per HPV-HR e LR;
- **Introduzione dell'analisi dei miRNA** per migliorare la caratterizzazione della lesione. Servono ancora di più ad individualizzare l'andamento della malattia e a personalizzare il protocollo del follow-up.

## BIBLIOGRAFIA

1. Michieli R. La vaccinazione anti-HPV per la prevenzione del cancro della cervice, *Rivista della Società Italiana di Medicina Generale*, Febbraio 2012
2. Signorelli C. HPV Human Papilloma virus. Infezione tumore alla cervice uterina vaccinazione, Società Editrice Universo, 2007 p. 28
3. David Forman et al. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vaccine*, 2012
4. Steenbergen RD, Snijders PJ, Heideman DA, Meijer CJ. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat Rev Cancer*. 2014 Jun;14(6):395-405
5. Mirabello L, Clarke MA, Nelson CW, Dean M, Wentzensen N, Yeager M, Cullen M, Boland JF; NCI HPV Workshop, Schiffman M, Burk RD. The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis. *Viruses*. 2018 Feb 13;10(2):80
6. International Agency for Research on Cancer (IARC). A review of human carcinogens: biological agents. Lyon; 2012.
7. Silvia de Sanjosé, Mireia Diaz, Xavier Castellsagué, Gary Clifford, Laia Bruni, Nubia Muñoz, F Xavier Bosch. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:453–59
8. Burd EM. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. (2003) 16:1–17
9. Sanclémente G, Gill DK. Human Papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J EADV* (2002) 16:231–240
10. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010 Aug;10(8):550-60
11. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. (1993) 75c; 495-505
12. SIAIP Società Italiana di Allergologia e Immunologia Pediatrica, Epidemiologia e clinica dell'infezione da HPV e del carcinoma della cervice, 2006
13. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet*. 2019 Jan 12;393(10167):169-182
14. Munoz N, Hernandez-Suarez G, Méndez F et al. Instituto Nacional de Cancerologia HPV Study Group. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer*, (2009). 100; 1184-1190.
15. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Rev Cancer*. (2002) 2:342–350
16. Munger K, Basile RJ, Duensing S et al (2001) Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20:7888–7898

17. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 2007 Oct;98(10):1505-11
18. Funk JO, Waga S, Harry JB et al. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* (1997) 11:2090–2100
19. Huh K, Zhou X, Hayakawa H. et al. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol.* (2007). 81: 9737-9747.
20. Liu Y, Chen JJ, Gao Q, Dalal S et al. Multiple functions of human Papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol.* (1999). 73:7297–7307
21. Day PM, Lowy DR, Schiller JT et al. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology.* (2003). 307:1–11
22. Phelps WC, Yee CL, Munger K, Howley PM. The human Papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell.* (1988)539–547
23. Funk JO, Waga S, Harry JB et al. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* (1997) 11:2090–2100
24. Remmink AJ, Walboomers JM, Helmerhorst TJ et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer.* (1995).61:306–311
25. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, Kommoss F, Löning T, Ordi J, Regauer S, Ridder R. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol.* 2011 Jun 1;121(3):505-9
26. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L, Girlando S, Rosso S, Naldoni C, Dalla Palma P, Zorzi M, Giorgi-Rossi P, Segnan N, Cuzick J, Ronco G; NTCC working group. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013 Feb;14(2):168-76
27. Molden T, Kraus I, Karlsen F et al. Comparison of human Papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2005) 14:367–372
28. Molden T, Kraus I, Skomedal H et al (2007) PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human Papillomaviruses. *J Virol Methods* 142:204–212
29. Aiom-Airtum: I numeri del cancro in Italia 2020
30. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71:209.

31. WHO. Globocan 2012. Estimated Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Cancer fact sheets. Cervical Cancer
32. Marc Arbyn et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health*. 2020 Feb;8(2):e191-e203.
33. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018, 68:394.
34. Beatriz Serrano et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018 Feb;47:14-26.
35. I numeri del cancro in Italia. 2020 AIRTUM-AIOM
36. Helen Trottier et al. Human Papillomavirus Infections with Multiple Types and Risk of Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(7).
37. R J Brescia, A B Jenson, W D Lancaster, R J Kurman. The role of human papillomaviruses in the pathogenesis and histologic classification of precancerous lesions of the cervix. *Hum Pathol*. 1986 Jun;17(6):552-9.
38. Rossi S, Crocetti E, Capocaccia R, Gatta G; AIRTUM Working Group. Estimates of cancer burden in Italy. *Tumori*. 2013 May-Jun;99(3):416-24
39. Stoler MH. New Bethesda Terminology and Evidence-Based Management Guidelines for Cervical Cytology Findings. *JAMA*. (2002). 287:2140–2141
40. Schiffman M, Castle PE. The promise of global cervical-cancer prevention. *N Engl J Med*. (2005) 353:2101–2214
41. Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res*. (2002) 89:229–240
42. Lejing Zang et al. Risk factors associated with the persistence of human papillomavirus after cervical excision in patients with high-grade squamous intra-epithelial neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021 Nov;266:175-181.
43. Catherine F Houlihan. Human papillomavirus infection and increased risk of HIV acquisition. A systematic review and meta-analysis. *AIDS*. 2012 Nov 13;26(17):2211-22
44. Panagiotis Tsikouras et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. *J BUON*. Mar-Apr 2016;21(2):320-5.
45. M Zorzi et al. Use of a high-risk human papillomavirus DNA test as the primary test in a cervical cancer screening programme: a population-based cohort study. *BJOG*. 2013 Sep;120(10):1260-7
46. Terresa J Eun, Rebecca B Perkins. Screening for Cervical Cancer. *Med Clin North Am*. 2020 Nov;104(6):1063-1078.
47. <https://www.osservatorionazionale screening.it/content/lo-screening-cervicale>



48. Xu Y, Dotto J, Hui Y, Lawton K, Schofield K, Hui P. High grade cervical intraepithelial neoplasia and viral load of high-risk human papillomavirus: significant correlations in patients of 22 years old or younger. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2(2):169-75.
49. Hoerl HD, Shalkham JE, Cheung K et al (2000) Screening parameters for Thin-Prep and conventional gynecologic cytology via automated monitoring. *Acta Cytol* 44:618–624
50. R Ashfaq et al. ThinPrep Pap Test. Accuracy for glandular disease. *Acta Cytol*. Jan-Feb 1999;(1):81-5.
51. Cuzick J, Meijer CJ, Walboomers JM. Screening for cervical cancer. *Lancet*. (1998) 351:1439–1440
52. Y Serour et al. HPV test by Hybrid Capture II for the diagnosis of HR-HPV persistent infection. *Med Mal Infect*. 2017 Nov;47(7):484-489
53. Raquel Ibáñez et al. Prediction of cervical intraepithelial neoplasia grade 2+ (CIN2+) using HPV DNA testing after a diagnosis of atypical squamous cell of undetermined significance (ASC-US) in Catalonia, Spain. *BMC Infect Dis*. 2012 Jan 26;12:25.
54. Jessica Valls Burness et al. Cervical Colposcopy: Indications and Risk Assessment. *Am Fam Physician*. 2020 Jul 1;102(1):39-48.
55. Edward J Mayeaux Jr et al. Systematic Review of International Colposcopy Quality Improvement Guidelines. *J Low Genit Tract Dis*. 2017 Oct;21(4):249-257
56. Nicolas Wentzensen et al. Evidence-Based Consensus Recommendations for Colposcopy Practice for Cervical Cancer Prevention in the United States. *J Low Genit Tract Dis*. 2017 Oct;21(4):216-222.
57. Partha Basu et al. Management of cervical premalignant lesions. *Curr Probl Cancer*. Mar-Apr 2018;42(2):129-136.
58. Nancy Santesso et al. Systematic reviews and meta-analyses of benefits and harms of cryotherapy, LEEP, and cold knife conization to treat cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet*. 2016 Mar;132(3):266-71
59. Jessica St. Laurent et al. HPV vaccination and the effects on rates of HPV-related cancers. *Curr Probl Cancer*. 42 (2018) 493–506
60. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/cervarix-epar-product-information\\_it.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/cervarix-epar-product-information_it.pdf)
61. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gardasil-epar-product-information\\_it.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gardasil-epar-product-information_it.pdf)
62. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gardasil-9-epar-product-information\\_it.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gardasil-9-epar-product-information_it.pdf)
63. Ministero della Salute. <https://www.salute.gov.it/portale/vaccinazioni/homeVaccinazioni.jsp>
64. Cristina Mendes de Oliveira et al. HPV Vaccine: Updates and Highlights. *Acta Cytol*. 2019;(2):159-168.