

Epidemiologia molecolare sull'HPV in una popolazione salentina a rischio nell'ultimo biennio

Andrea Tinelli*, Giuseppe Leo**, Ilenia Guglielmo***, Maurizio Pisanò**, Fabio Storelli**, Elena Pitotti**, Maria Maddalena Galante**, Daniele Vergara°, Raffaele Tinelli*, Antonio Malvasi°, Marcello Guido°°°

*Unità Operativa di Ginecologia e Ostetricia, Ospedale Vito Fazzi, ASL Lecce

**Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LBMOS), Ospedale Vito Fazzi, ASL Lecce

***Laboratorio di Igiene dell'Università del Salento, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali (Di.S.Te.B.A.), Università del Salento, Lecce

° NNL – National Nanotechnology Laboratory, CNR-INFM, Università del Salento, Lecce

°°Dipartimento di Ginecologia e Ostetricia, Clinica "Santa Maria", Bari

°°°Laboratorio di Igiene dell'Università del Salento, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali (Di.S.Te.B.A.), Università del Salento, Lecce

Riassunto

Introduzione: I papillomavirus umani (HPV) sono piccoli virus a DNA, suddivisi vari genotipi, con rischio di trasformazione oncogena per integrazione del DNA virale nel DNA cellulare; nello studio abbiamo cercato di discriminare i singoli genotipi di HPV in una popolazione salentina a rischio, afferente al Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LBMOS) del Presidio Ospedaliero "Vito Fazzi" di Lecce.

Materiali e metodi: Durante il biennio 2006-2007, sono stati analizzati 816 campioni di muco cervico-vaginale di donne con sospetto di HPV, o recente/pregresso episodio di infezione, con amplificazione di ORF L1. Con sequenziamento e ibridazione con sonde, siamo andati a ricercare ogni specifico genotipo di HPV presente nella popolazione a rischio.

Risultati: Analizzando 816 campioni, l'HPV è risultato essere presente in 183 casi (22.4%), con un trend di crescita dal 19% del 2006 al 27% del 2007; la ricerca dei genotipi ha prodotto 37 genotipi differenti di HPV e, fra questi, i casi con maggiore frequenza sono stati quelli di HPV-16 con 37 casi (13,81%), seguiti dall'HPV-6 con 27 casi (10.07%), dal-

INTRODUZIONE

I papillomavirus umani (HPV) sono piccoli virus nudi a DNA, ubiquitari, suddivisi in più di 200 genotipi; ulteriormente suddivisi in virus ad alto, medio e basso rischio sulla base delle lesioni a cui sono associati. I gruppi ad alto rischio sono implicati nello sviluppo di tumori altamente maligni, in particolare del cancro alla cervice uterina e di altri tumori del tratto anogenitale, mentre quelli a basso rischio sono comunemente rilevabili nelle verruche a livello genitale. (1)

Nelle lesioni indotte dall'HPV "high risk" (HR-HPV), quali, ad esempio, HPV-16 e HPV-18, avviene l'integrazione del DNA virale nel DNA cellulare, motivo per cui tali lesioni sono "a rischio di trasformazione tumorale". (2)

Dal punto di vista epidemiologico, si stima che oltre il 50% delle donne sessualmente attive si infetti nel corso della vita con un virus HPV ad alto rischio oncogeno, anche se, fortunatamente, il 70-90% delle infezioni è transitoria, in quanto l'HPV viene eliminato dal sistema immunitario. (3)

Al fine di determinare preliminarmente la situazione epidemiologica dell'HPV in una popolazione mirata di donne salentine a rischio per infezione da HPV, afferenti al Laborato-

rio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LBMOS) del Presidio Ospedaliero "Vito Fazzi" di Lecce, abbiamo avviato una raccolta e classificazione di dati per: determinare quale sia il genotipo prevalente nel nostro nucleo territoriale, quello cioè riscontrato con maggiore frequenza, definire la presenza di eventuali casi di co-infezione o infezione multipla da HPV e i genotipi specifici coinvolti e dimostrare come il sequenziamento molecolare rappresenti realmente la migliore tecnica di laboratorio nel definire con precisione se l'infezione da HPV sia determinata da uno o più genotipi virali.

MATERIALI E METODI

Abbiamo analizzato 816 campioni di muco cervico-vaginale raccolti nel LBMOS mediante *scrape cervicale*, durante il periodo compreso fra il 1° gennaio 2006 e il 31 ottobre 2007; in tali pazienti di sesso femminile era stato ipotizzata una sospetta infezione da HPV o vi era già stata la conferma di un recente o pregresso episodio di infezione da HPV.

La positività all'HPV in queste pazienti è stata evidenziata in laboratorio mediante amplificazione di una specifica sequenza del DNA virale (ORF L1) con la reazione polimerasica

l'HPV-53 con 25 casi (9.33%) e, infine, HPV-31 con 21 casi (7.84%). Successivamente apparivano, con percentuali inferiori, il genotipo 53 (MR-HPV), il genotipo 31 e il genotipo 18 (HR-HPV), poi il genotipo 66 (MR-HPV), il genotipo 58 (HR-HPV) e il ceppo 61 (MR-HPV).

Conclusioni: Il sequenziamento molecolare risulta il "Gold Standard" nella ricerca dell'HPV; tale metodica ha individuato, nel territorio salentino, una maggiore presenza di HPV-16 seguito, in misura ridotta, dall'HPV-6 e da altri ceppi. Tali percentuali dimostrano una specifica realtà epidemiologica e, probabilmente, tali dati, se implementati, potrebbero rivelare una realtà differente rispetto a quella della letteratura scientifica, utile per programmare la profilassi vaccinale e la realizzazione di nuovi vaccini mirati.

Parole chiave

HPV
Sequenziamento molecolare
PCR
Sonde molecolari
Vaccinazione

Summary

Molecular epidemiology on HPV in a salentinian at risk population in the last two years

Introduction: Human papillomavirus (HPV) are small DNA virus, subdivided in various genotypes, with a transforming neoplastic risk for viral DNA integration in cellular DNA; in this study we tried to discriminate single HPV genotype in at risk salentinian population, referent to Biological Molecular and Experimental Oncological Lab (LBMO) of "Vito Fazzi" Hospital of Lecce.

Material and methods: during 2006-2007, we analyzed 816 cervical-vaginal samples of women at risk for HPV infection or with recent/previous HPV infection, by ORF L1 amplification. By sequencing and hybridization, we checked each specifically HPV genotype of the population.

Results: Analyzing 816 samples, HPV was present in 183 cases (22.4%), with an increasing trend of 19% in 2006 to 27% in 2007; the genotype research evaluated 37 different HPV genotypes and, between them, the high frequent cases were HPV-16 with 37 cases

a catena (PCR) e, i prodotti della PCR, sono stati utilizzati per il sequenziamento del DNA (4); tale specifica sequenza ORF L1 del genoma virale si riscontra espressivamente in pazienti che hanno un'infezione produttiva da HPV e la sua rilevazione è stata determinata mediante corsa elettroforetica sul gel di agarosio, andando ad osservare la formazione di una specifica banda, singola e ben evidente, di 450 bp. (4)

Nelle pazienti positive all'esame molecolare, mediante l'utilizzo di fini metodi diagnostici quali il sequenziamento e l'ibridazione molecolare, siamo andati a ricercare il genotipo responsabile dell'infezione in modo tale da poterlo classificare come high-risk (HR), medium-risk (MR) o low-risk (LR) HPV e, per fare ciò, abbiamo dunque utilizzato il sequenziamento molecolare dell'HPV, che attualmente rappresenta un mezzo diagnostico altamente significativo per distinguere l'infezione da HPV da un singolo genotipo da un altro. Per poter dunque valutare, in maniera indicativa, il grado di rischio oncogeno di uno specifico genotipo HPV è stata utilizzata la tecnologia Real Time-PCR (con utilizzo della molecola fluorescente SYBR GREEN) ed, in particolare, lo studio della Temperatura di melting (Tm) ad essa associato. (5)

La Temperatura di melting rappresenta la temperatura alla quale il 50% del DNA di uno specifico organismo (batterico, virale o umano) risulta denaturato (in cui si verifica la separazione completa del doppio filamento da amplificare successivamente); tale temperatura dipende dalla percentuale delle basi Guanina e Citosina presenti nel filamento target

di interesse: maggiore è questa percentuale, più alta sarà la temperatura che bisognerà utilizzare per effettuare la denaturazione della sequenza nucleotidica corrispondente. (6)

Poiché i diversi genotipi HPV differiscono tra loro proprio per la composizione in basi della specifica sequenza di DNA, abbiamo utilizzato Temperature di melting "personalizzate" in modo tale da operare un'indicativa classificazione tra HPV, in HR, MR e LR.

In questo modo, abbiamo potuto discriminare in maniera approssimativa gli HPV e, allo stesso tempo, avere un'ulteriore indicazione della presenza di infezione mediante l'analisi del segnale di fluorescenza direttamente proporzionale all'amplificazione della specifica regione virale L1, cruciale per la diagnosi di positività all'HPV. (7)

RISULTATI

Dall'analisi dei campioni, abbiamo individuato positività all'HPV in 183 casi (22.4% del totale); analizzando l'andamento dei casi positivi nei rispettivi anni, si è osservato che nel 2006 tale percentuale era del 19%, cresciuta nei primi dieci mesi del 2007 sino al 27% (Tabella 1).

Sui campioni positivi abbiamo individuato 37 genotipi differenti di HPV, classificati, come detto, in LR, MR, HR-HPV oncogeno secondo la classificazione di Munoz et al, NEMJ 2003 (tabella 2).

I dati ottenuti hanno evidenziato 37 casi di HPV-16 (HR-HPV) con maggior frequenza (13,81%), seguiti dall'HPV-6 (LR-HPV) con 27 casi (10.07%), dall'HPV-53 (MR-HPV) con 25 casi (9.33%), poi 21 casi di genotipo 31

TABELLA 1. Analisi del totale dei casi segnalati per la ricerca del HPV e casi realmente positivi all'HPV nel 2006 e sino al 31 ottobre del 2007

	Sospetto per HPV	Casi reali di HPV	% reale di infezione
2006	488	93	19%
2007	328	89	27%

TABELLA 2. Classificazione dei principali genotipi di HPV (in basso, medio ed alto rischio) in base al loro capacità di indurre trasformazione neoplastica. (modificata da Munoz et al, NEMJ 2003)

Gruppo di HPV	Genotipo di HPV
Alto rischio	16,18,31,33,35,45,56,58,59,68,82
Rischio intermedio	39,51,52,53,54,61,66,70
Basso rischio	6,11,40,42,73,84,89

(13,81%), followed by HPV-6 with 27 cases (10,07%), HPV-53 with 25 cases (9,33%) e, finally, HPV-31 with 21 cases (7,84%). Successively they appeared, with less percentage, genotype 53 (MR-HPV), genotype 31 and genotype 18 (HR-HPV), than genotype 66 (MR-HPV), genotype 58 (HR-HPV) and HPV 61 (MR-HPV).

Conclusions: : the molecular sequencing is the "Gold Standard" in HPV research; this method showed, in salentinian land, a main presence of HPV-16 followed, in a reduced measure, from HPV-6 and other genotypes. These percentages show a specific epidemiological reality and, probably, these dates, if increased, could reveal a different reality than the scientific literature outlook, useful to programming the vaccine prophylaxis and the realization of new targeting vaccines.

Key words

HPV
Molecular sequencing
PCR
Molecular probe
Vaccination

TABELLA 3. Relazione tra singolo genotipo di HPV identificato e corrispondente numero di casi positivi, in pazienti con HPV, nell'arco del biennio 2006-2007

Specifico genotipo di HPV	N° di volte che l'HPV è riscontrato nelle donne positive
Totale genotipi: 37	Totale: 268
16	37/268 (13,81%)
6	27/268 (10,07%)
53	25/268 (9,33%)
31	21/268 (7,84%)
18	14/268 (5,22%)
66	14/268 (5,22%)
58	10/268 (3,73%)
61	10/268 (3,73%)
51	9/268 (3,36%)
70	9/268 (3,36%)
42	8/268 (2,98%)
62	8/268 (2,98%)
24	1/268 (0,37%)
26	1/268 (0,37%)
33	4/268 (1,49%)
35	2/268 (0,75%)
39	4/268 (1,49%)
40	1/268 (0,37%)
45	5/268 (1,86%)
52	1/268 (0,37%)
54	6/268 (2,24%)
55	2/268 (0,75%)
56	4/268 (1,49%)
59	5/268 (1,86%)
67	1/268 (0,37%)
68	2/268 (0,75%)
72	1/268 (0,37%)
73	2/268 (0,75%)
81	2/268 (0,75%)
82	1/268 (0,37%)
83	3/268 (1,12%)
84	4/268 (1,49%)
86	1/268 (0,37%)
89 (CP 6108)	10/268 (3,73%)
52/33/35/58	8/268 (2,98%)
IS223 (chiamata Variante 73)	1/268 (0,37%)

(HR-HPV), con il 7,84% del totale e via discorrendo.

Successivamente apparivano, con percentuali inferiori, il genotipo 53 (MR-HPV), il genotipo 31 e il genotipo 18 (HR-HPV), poi il genotipo 66 (MR-HPV), il genotipo 58 (HR-HPV) e il ceppo 61 (MR-HPV).

Tali dati sono evidenziati nella tabella 3.

DISCUSSIONE

Dai dati rilevati dal nostro studio appare evidente come i genotipi di HPV individuati dall'analisi molecolare siano in parte dif-

ferenti da quanto viene evidenziato dalla letteratura internazionale (8); difatti, a parte il genotipo 16, il secondo genotipo frequente è il genotipo 6, maggiormente coinvolto nello sviluppo di lesioni condilomatose (9); quindi, come evidente dai dati ottenuti dal nostro studio, ben differente dall'epidemiologia riportata nella letteratura scientifica, appare il quadro salentino nel caso di pazienti a rischio per lesioni genitali da HPV

E, da quanto emerge dall'analisi dei nostri dati, riteniamo opportuno estendere e consiglia-

re, ai fini clinici ed epidemiologici, l'analisi del muco cervico-vaginale a tutte le donne in età riproduttiva o a rischio di contagio, per ottenere la ricerca sistematica dell'HPV.

La valutazione biologica molecolare attualmente riveste un'importanza significativa sia nel diagnosticare l'effettiva presenza dell'HPV, sia nell'indicare lo specifico genotipo responsabile dell'infezione che nel fornire informazioni su possibili infezioni miste da HPV. (10) Da quanto detto, appare evidente come il sequenziamento molecolare rappresenti il "Gold Standard" in quanto permette di identificare, con massima precisione e specificità, quale genotipo di Papillomavirus è presente nel campione in esame. (11)

Da quanto affermato in questa ricerca, l'analisi epidemiologica precisa dei vari genotipi "territoriali" potrebbe condurre ad una possibile vaccinazione capillare territoriale contro tale genotipo, con riduzione della diffusione di alcuni ceppi pericolosi.

Appare ipotizzabile inoltre che ogni realtà ter-

ritoriale, se non addirittura locale, possa presentare caratteristiche proprie sia per frequenza di specifici genotipi che per effettivo potere oncogeno, motivo per cui le indicazioni delle ricerche epidemiologiche, dovrebbero sempre essere considerate dalle singole ASL regionali di appartenenza della popolazione studiata, in quanto i programmi di screening vaccinale dovrebbero basarsi su dati affidabili e reali, circa i genotipi maggiormente presenti.

CONCLUSIONI

Il sequenziamento molecolare dell'HPV rappresenta, a tutt'oggi, la tecnica "Gold Standard" nel delineare, con precisione, il genotipo virale scatenante l'infezione virale, in quanto unica metodica capace di determinare l'effettiva sequenza nucleotidica del filamento di DNA virale (con analisi di ogni singola base) e, al tempo stesso, diagnostica indicativa di possibile infezione multipla da HPV, in grado di dettagliare la presenza di uno o

più genotipi di HPV in contemporanea. (12) Secondo quanto affermato, da un'analisi territoriale regionale, l'attuale presenza e classificazione dei vari genotipi di HPV, in HR, MR e LR-HPV (13) potrebbe anche essere rivista alla luce di dati epidemiologici più precisi e dettagliati, così come, sulla scorta di analisi molecolari affidabili ed efficaci, discriminando fra co-infezioni, si potrebbero realizzare nuovi vaccini (14) mirati per ogni singola popolazione, in base all'area di appartenenza. In ai nostri dati preliminari, è dunque auspicabile che la politica sanitaria nazionale consideri la possibilità di intraprendere nuovi programmi di screening regionali per l'HPV in ogni singola provincia, in modo da mappare dettagliatamente la presenza dei vari genotipi territorio per territorio; difatti le percentuali da noi riportate, dimostrano una specifica realtà virale nel Salento e, probabilmente, tali dati, se implementati, potrebbero rivelare una realtà differente rispetto a quella della letteratura scientifica.

BIBLIOGRAFIA

1. Tinelli A, Vergara D, Leo G et al. Human papillomavirus genital infection in modern gynaecology: genetic and genomic aspects. *Eur Clinics Obstet Gynaecol* 2007; 3:1-6
2. Corden SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Mol. Pathol.* 1999; 52: 275-282
3. Centurioni MG, Puppo A, Merlo DF, Pasciuccio G, Cusimano ER, Siritto R, Gustavino CA. Prevalence of human papillomavirus cervical infection in an Italian asymptomatic population. *BMC Infect Dis.* 2005; 5: 77
4. Tinelli A, Vergara D, Leo G et al. Infezione da hpv (human papilloma virus): una panoramica attuale. *Rivista di Ostetricia, Ginecologia pratica e Medicina Perinatale* 2006; 21(1/2): 15-23
5. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, et al. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other

- HPV types. *J Infect Dis* 2001; 183: 8-15
6. Tinelli A, Vergara D, Leo G et al. Approccio biomolecolare nella diagnostica dell'hpv: il ruolo delle nuove tecnologie nello studio dell'hpv-dna. *attualità e prospettive. La Rivista Italiana di Ostetricia e Ginecologia* 2006; 12(3):597-604
7. Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 1999; 274: 2696-2705
8. Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, Icenogle J, Reeves WC, Kaufman RH. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 257-264
9. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 342-350
10. Bosch F, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical

- cancer: a worldwide perspective. *International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802
11. Munger K, Phelps WC, Bubbs V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989; 63: 4417-4421
12. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Shiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 1989; 8: 3905-3910
13. Stanley M. Immune intervention in HPV infections: current progress and future developments. *Expert Rev Vaccines.* 2003; 2(5): 615-7.
14. Frazer IH, Cox JT, Mayeaux EJ, Franco EL, et al. Advances in prevention of cervical cancer and other Human Papillomavirus-related diseases. *Ped Infect Dis J* 2006; 25:S65-S81