

Confronto tra sequenziamento molecolare e test di ibridizzazione con sonde oligonucleotidiche nella ricerca dell'infezione singola e multipla da HPV in una popolazione salentina

Andrea Tinelli*, Giuseppe Leo°, Maurizio Pisanò°, Fabio Storelli°, Anna Maria Nuzzo°, Simona Volpe°, Valeria Mezzolla°, Raffaella Tunno°, Maria Maddalena Galante°, Maria Rosa Montinari**

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 Citologia e Anatomia Comparata, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, DISTEBA, Università del Salento, Lecce

Riassunto

Introduzione. L'HPV è un piccolo virus a DNA responsabile di molte lesioni benigne e maligne dell'apparato genitale femminile e maschile; nel nostro studio abbiamo determinato la prevalenza singola o multipla di HPV in pazienti a rischio, per definire la presenza di eventuali casi di co-infezione da HPV ed vari genotipi coinvolti e, infine, dimostrare quale sia la tecnica molecolare più affidabile nell'individuare l'infezione singola o multipla da HPV.

Materiali e metodi: nel Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LBMOS) del Presidio Ospedaliero "Vito Fazzi" di Lecce, abbiamo analizzato 830 campioni di muco cervico-vaginale di donne a rischio di HPV, con amplificazione della regione L1 del DNA virale, il sequenziamento è stato effettuato con l'impiego della tecnologia REAL-TIME PCR, utilizzando la molecola fluorescente SYBR Green ed i primer MY09 e MY11. Nelle pazienti HPV positive, abbiamo effettuato il test di tipizzazione molecolare con ibridazione dei prodotti di amplificazione mediante delle sonde oligonucleotidiche, per identificare possibili infezioni multiple da HPV.

Risultati: in 830 campioni, l'HPV è risultato essere presente in 190 casi (22.8%); il singolo genotipo identificato con sequenziamento mo-

INTRODUZIONE

L'HPV (Human Papilloma Virus) è un virus responsabile di molte lesioni dell'apparato genitale femminile e maschile; tale virus si trasmette prevalentemente con l'attività sessuale, ha una massima incidenza tra i 20 e i 40 anni e, oltre che per via sessuale, via più frequente, si trasmette mediante effetti letterci che siano venuti a contatto con persone infette (tipo biancheria o asciugamani).

Si contano più di un centinaio di sottotipi di HPV con caratteristiche di adattabilità e oncogenicità diverse, i quali vengono suddivisi, a seconda dell'aggressività, in HPV a basso (6, 11, 42, 43, 44) ed alto (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) rischio, motivo per cui, in caso di infezione da HPV, è buona norma ricercare e tipizzare il virus, identificandone il sottotipo. (1)

Le manifestazioni patologiche dell'HPV variano anche secondo le caratteristiche dei distretti anatomici interessati: le lesioni che si sviluppano a livello della cute perineale e perianale e quelle a carico di vulva e vagina, i condilomi, conseguenti ad infezioni da HPV a basso rischio, sono visibili anche a occhio nudo e possono avere l'aspetto di lesioni piane, rilevate o verrucose, di dimensioni variabili, singole o multiple. (2)

Nei genitali e nella regione anale l'HPV trova il miglior substrato ove attecchire e sviluppare; infatti, in questi distretti anatomici il virus trova un terreno favorevole alla crescita, di tipo caldo umido, con abbondanza di sostanze nutritive e un rivestimento mucosale meno resistente.

Oltre agli organi genitali ed alla regione anale, perianale e perineale, il virus può svilupparsi nelle regioni rettale, uretrale, nel meato uretrale, sulle labbra, all'interno della bocca, sulla cute e in rari casi sulla laringe (3). Per quanto riguarda l'utero, la zona più facilmente aggredibile dal virus è la giunzione squamo-colonnare del collo, dove le cellule cilindriche del canale uterino vengono in contatto con quelle che rivestono l'esocervice. In questa zona, le cellule dell'epitelio squamoso infettate da ceppi HPV ad alto rischio che presentino alterazioni citologiche (lesione squamosa intraepiteliale), hanno una maggiore probabilità, dipendente dalla severità delle alterazioni stesse, di progredire verso il cancro.

L'HPV, infatti, essendo un virus a DNA, "solo quando" integra il suo patrimonio genetico nel DNA delle cellule ospiti, ha la possibilità di trasformarle prima in cellule pre-neoplastiche e poi in cellule neoplastiche (can-

lecolare è stato confrontato con quello rilevato dalle sonde molecolari oligonucleotidiche: il risultato era concordante nel 90% dei casi, con discordanza solo nel 10%. Analizzando poi i casi di co-infezione o infezione mista, su 31 casi di infezione multipla solo 8 risultavano concordi (26%), mentre i restanti 23 casi invece hanno evidenziato la presenza di un'infezione mista. Infine, esaminando il rapporto tra casi totali di concordanza e discordanza, ottenuti dall'analisi combinata, le due tecniche utilizzate in associazione hanno riportato gli stessi risultati nel 62%.

Conclusioni: con l'analisi combinata con sequenziamento e ibridazione con sonde oligonucleotidiche, abbiamo tipizzato con notevole precisione le infezioni singole e multiple da HPV, anche se, tuttavia, la comparazione fra le due tecniche ha promosso la prima come la tecnica maggiormente affidabile e precisa. Vista l'importanza del problema HPV-cervicocarcinoma-vaccinazione, non è più possibile parlare in termini approssimativi del "test sicuro" che individua l'HPV con certezza e, secondo i nostri dati, prima di affermare il o i tipi di HPV presenti nella donna, è sempre necessario discriminare, da subito, fra le tecniche di indagine da utilizzare nella ricerca di HPV.

Parole chiave

HPV, sequenziamento molecolare
Co-infezioni PCR
Sonde molecolari
Tipizzazione

Summary

Comparison between molecular sequencing and hybridization test by oligonucleotide probes in single and multiple hpv infection research in a salentinian population

Introduction: HPV is a small DNA virus, responsible for many benign and malign diseases; in our evaluation we establish the single and multiple HPV infection prevalence in high risk patient, to settle the eventual HPV co-infections and the various genotyping presence and, finally, to show which is the most trustworthy molecular technique in detection of single and multiple HPV infections.

Material and methods: in Biological Molecular and Experimental Oncological Lab

cro della cervice). I meccanismi molecolari coinvolti nell'insorgenza del carcinoma cervicale sono ormai noti: l'oncoproteina E6 presente nei ceppi ad alto rischio si lega al gene oncosoppressore p53 e ne accelera la degradazione proteolitica, mentre la proteina E7 si lega al gene del retinoblastoma RB, spostandone i fattori di trascrizione e modificando anche qui la regolazione del ciclo cellulare (4).

Il metodo d'elezione per la rivelazione di una probabile infezione da HPV è ancora l'esame citologico cervicale, il Pap Test; tale test descrive le lesioni precancerose cervicali attraverso un sistema di classificazione (di Bethesda) introdotto nel 1988 e corretto la prima volta nel 1991 allo scopo di standardizzare la refertazione e tracciare quindi le linee guida terapeutiche per il trattamento delle lesioni non invasive a potenziale maligno ancora incerto.

L'ultimo aggiornamento del sistema di classificazione è del 1999, con rivisitazione nel 2001, al fine di stimare con maggior accuratezza il rischio neoplastico di una lesione riscontrata al pap-test o mediante colposcopia, attraverso l'utilizzo di nuove metodiche di screening, i test molecolari, i quali si basano sulla tecnica PCR (5).

Un'accurata diagnosi, infatti, si basa ora anche sulla rivelazione dell'acido nucleico virale, in quanto si è notato da una parte, che un numero elevato di donne va incontro all'insorgenza del carcinoma cervicale nonostante la partecipazione a programmi di prevenzione; dall'altra, che la sensibilità stimata dello screening citologico nel diagnosticare una lesione cervicale non supera l'80% (6).

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 (7).

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 Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LBMOS) del Presidio Ospedaliero "Vito Fazzi" di Lecce, abbiamo avviato una raccolta e classificazione di dati per: determi-

nare la prevalenza dell'HPV nei campioni a rischio esaminati, definire la presenza di eventuali casi di co-infezione o infezione multipla da HPV ed i genotipi specifici coinvolti e, infine, 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

Un gruppo di 830 donne nelle quali si ipotizzava una possibile infezione da HPV sono state inviate nel Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LBMOS), dell'Ospedale "Vito Fazzi" di Lecce, ove, al fine di ricercare la positività all'HPV, è stato effettuato uno scrape cervicale, nel periodo compreso fra il gennaio 2007 e il giugno 2008, per raccogliere del muco cervico-vaginale per ricercare l'HPV-DNA.

Tali campioni sono stati analizzati mediante l'amplificazione della regione L1 del genoma virale, una regione altamente conservata presente in tutti i genotipi di HPV, che codifica per la proteina capsidica maggiore del virus. L'amplificazione è stata ottenuta attraverso l'impiego della tecnologia REAL-TIME PCR, utilizzando la molecola fluorescente SYBR Green ed i primer MY09 e MY11 diretti verso una regione di 450 bp all'interno dell'ORF L1.

L'analisi del segnale fluorescente emesso, che risulta essere direttamente proporzionale all'amplificazione della regione virale L1, ha permesso di rilevare la presenza di un'infezione da HPV.

Inoltre, attraverso l'analisi della Temperatura di melting (T_m), è stato possibile operare una classificazione indicativa tra genotipi di HPV ad alto e a basso rischio.

La Temperatura di melting (temperatura alla quale il 50% del DNA di un organismo risulta denaturato) dipende, infatti, dalla percentuale delle basi Guanina e Citosina presenti nel filamento target ed i diversi genotipi di HPV differiscono tra di loro proprio per quanto riguarda la composizione in basi dello specifico filamento di DNA.

Successivamente si è proceduto, per le pazienti risultate positive all'HPV, con l'identificazione del genotipo di HPV responsabile dell'infezione, mediante l'utilizzo di una tecnica che sfrutta il principio dell'ibridazione

(LBMOs) of "Vito Fazzi" Hospital of Lecce, we analyzed 830 cervical-vaginal samples of women at risk for HPV infection, by L1 viral DNA amplification. The DNA sequencing was by REAL-TIME PCR technologic use, utilizing the fluorescent SYBR Green molecule and MY09 and MY11 primer. In HPV positive women we used molecular genotyping test by hybridization of amplification products with oligonucleotide probes, to detect possible co-infections f HPV.

Results: HPV was present in 190 cases on 830 samples (22.8%); the single genotype identified by molecular sequencing was compared with whom of oligonucleotide probes: the result was in agreement in 90% of cases and clashing in 10%. Analyzing the co-infection cases, on 31 cases of mix cases of HPV infection only 8 were in agreement (26%), while in 23 cases a co-infection of HPV was present (by not agreement of methods). Finally, valuing the relationship between the case in agreement or not, obtained by the combinatory analysis, the two techniques reported the same results in 62% of cases, if used in association.

Conclusions: by combined analysis with molecular sequencing and hybridization by oligonucleotide probes in the studied population, we checked each specifically HPV genotype and the HPV co-infections, even if, the comparison of the two techniques promoted the first one as the main precise method of analysis. Seeing the actuality of the problem HPV-cervicocarcinoma-vaccine, it is impossible to speak in superficial term of "secure test" to detect certainty the HPVs and, by our dates, before to affirm the single or multiple HPV infection, it is always to discriminate, immediately, between the molecular technique in the HPV research.

Keywords

HPV
Molecular sequencing
PCR
Co-infections
Molecular probes
Genotyping

TABELLA 1. Analisi del totale degli 830 casi segnalati per la ricerca del Papillomavirus (HPV) e casi realmente positivi all'HPV nel 2007 e sino al giugno del 2008

	Sospetto per HPV	Casi reali di HPV	% Reale di infezione
2007	495	102	20.6%
2008	360	96	26.6%

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

dei prodotti di amplificazione con delle sonde oligonucleotidiche specifiche per i singoli genotipi di HPV.

Sfruttando le potenzialità delle due procedure diagnostiche suddette, il sequenziamento molecolare e l'ibridazione dei prodotti di amplificazione con delle sonde oligonucleotidiche (test di tipizzazione molecolare), abbiamo potuto delineare la presenza di possibili infezioni miste o co-infezioni virali di singoli genotipi.

RISULTATI

Dall'analisi degli 830 campioni di donne a rischio di HPV, abbiamo individuato positività all'HPV in 190 casi (22.8% del totale); analizzando l'andamento dei casi positivi nei rispettivi anni, si è osservato che nel 2007 tale percentuale era del 20.6%, cresciuta sino al giugno del 2008 al 26.6% (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).

Si è poi passati ad analizzare tutti i casi di concordanza da infezione singola (mono infezione) da HPV, ottenuti dal confronto tra il singolo genotipo identificato mediante sequenziamento molecolare e quello corrispondente rilevato attraverso l'uso di apposite sonde molecolari.

I risultati di tale analisi sono riportati nella tabella 3.

Il confronto fra il numero delle singole infezioni evidenziate mediante la tecnica del

sequenziamento e il numero delle infezioni ottenute con l'utilizzo delle sonde molecolari ha evidenziato un risultato concordante nel 90% dei casi (36/40), mentre solo nel 10% dei casi si è riscontrato un risultato discordante (4/40), come evidenziato nella tabella 4.

Analizzando poi i casi di co-infezione o infezione mista, non abbiamo ottenuto gli stessi risultati precedentemente descritti (come riportato nella tabella 5): su 31 casi di co-infezione, solo 8 risultavano concordi (26%), mentre nei restanti 23 casi (74%), il singolo genotipo ottenuto mediante la tecnica del sequenziamento non è stato confermato dall'utilizzo di specifiche sonde molecolari, che invece hanno evidenziato in tutti i casi la presenza di un'infezione mista, come riportato nella tabella 6, in cui sono elencati tutti i casi non concordanti (non reali) di co-infezione da HPV (determinati dall'analisi del singolo genotipo identificato con il sequenziamento e quelli multipli ottenuti attraverso l'utilizzo di specifiche sonde molecolari).

Infine, esaminando il rapporto tra casi totali di concordanza e quelli di discordanza ottenuti dall'analisi combinata dei differenti genotipi di HPV attraverso il sequenziamento e l'utilizzo di specifiche sonde molecolari, si deduce che nel 38% dei casi non c'è correlazione tra i risultati ottenuti con la tecnica del sequenziamento e l'utilizzo di specifiche sonde molecolari (27/71), mentre nel 62% dei casi le due tecniche utilizzate hanno riportato gli stessi risultati (44/71), come evidenziato nella tabella 7.

DISCUSSIONE

Dal confronto fra le tecniche, è emerso che il sequenziamento molecolare dell'HPV, che rappresenta un mezzo diagnostico altamente significativo per distinguere l'infezione da HPV causata da un singolo genotipo rispetto a quella multipla, è maggiormente speci-

fico rispetto all'ibridazione con sonde oligonucleotidiche nell'individuare ed interpretare i casi di co-infezione da HPV.

Considerando i casi di mono-infezione, nel confronto tra il numero delle singole infezioni evidenziate mediante la tecnica del sequenziamento e quelle ottenute con l'utilizzo del-

le sonde molecolari, i risultati, come detto, sono stati concordi nel 90% dei casi, mentre solo nel 10% dei casi è stato riscontrato un risultato discordante.

Tale comparazione permette di definire come "affidabile" l'utilizzo delle sonde nei casi di mono-infezione da HPV, anche se appare quanto meno discutibile la scelta della metodica come screening, visto che non ci è dato di sapere se una donna abbia o meno un solo genotipo di HPV, prima di studiarla con analisi molecolare.

Analizzando poi i casi di infezione mista da vari genotipi da HPV, non abbiamo ottenuto gli stessi risultati della comparazione precedente, in quanto su 31 casi di co-infezione, solo 8 risultavano concordi (26%) contro i restanti 23 casi discordanti (74%); il singolo genotipo ottenuto individuato dalla tecnica del sequenziamento non è stato dunque confermato dall'utilizzo di sonde molecolari, che invece hanno evidenziato in tutti i casi la presenza di un'infezione mista.

Comparando il rapporto tra casi totali di concordanza e quelli di discordanza ottenuti dall'analisi combinata dei differenti genotipi di HPV attraverso il sequenziamento e l'utilizzo di specifiche sonde molecolari, i risultati indicano che nel 38% dei casi non c'è correlazione tra i risultati della tecnica del sequenziamento e l'utilizzo di specifiche sonde molecolari, mentre nel 62% dei casi le due tecniche utilizzate hanno riportato gli stessi risultati.

Dal confronto, dunque, tra genotipi identificati mediante il sequenziamento e quelli corrispondenti rilevati attraverso l'utilizzo di sonde molecolari, è emerso quale fosse il reale grado di concordanza tra le due procedure diagnostiche nell'analizzare i differenti genotipi dell'HPV sia nei casi di infezione singola che di co-infezione da HPV.

Dai dati rilevati nel nostro studio, appare evidente come i genotipi di HPV individuati nel confronto fra le due metodiche molecolari siano differenti da quanto viene evidenziato dalla letteratura biologica strumentale internazionale (8-10).

Essendo la valutazione biologica molecolare l'esame che attualmente riveste un'importanza significativa, sia nel diagnosticare l'effettiva presenza dell'HPV (5), sia nell'indicare lo specifico genotipo responsabile dell'infezione (11),

TABELLA 3. Casi di concordanza di mono-infezione da HPV ottenuti attraverso il confronto tra il singolo genotipo identificato mediante il sequenziamento e quello corrispondente rilevato attraverso l'uso di apposite sonde molecolari. In rosso, invece, sono evidenziati i 4 casi discordanti di mono-infezione nei quali il genotipo ottenuto mediante l'analisi del sequenziamento è risultato completamente differente da quello riscontrato attraverso l'utilizzo delle sonde molecolari

Mono-infezioni da HPV: casi di concordanza tra singolo genotipo identificato con il sequenziamento e quello corrispondente rilevato attraverso specifiche sonde molecolari

6	6
6	6
6	6
6	6
6	6
6	6
6	6
16	16
16	16
16	16
16	16
16	16
16	16
16	16
16	16
16	16
16	16
16	16
16	16
16	16
16	16
16	16
18*	58*
31	31
31	31
31*	31*
33	33
33	33
53	53
53	53
53	53
53	53
53*	53*
58*	18*
58	58
61	61
61	61
62	62
62	62
70	70
84	84
89	89

sia nel fornire informazioni su possibili co-infezioni da HPV, non è più possibile parlare del test che individua l'HPV in termini approssimativi (12), anche per definire la reale valenza (rapporto costi-benefici) dei programmi di vaccinazione (13).

Infatti, secondo i risultati di questa ricerca, è necessario discriminare l'analisi epidemiologica a seconda delle tecniche di indagine utilizzate, per poter meglio definire i vari genotipi "territoriali", prima di effettuare una valutazione su una possibile vaccinazione territoriale contro un singolo genotipo o un gruppo di genotipi endemici.

Da un ragionamento sul ciclo biologico del virus, appare anche ipotizzabile che ogni ambito territoriale possa anche presentare specifiche caratteristiche sia per frequenza che per diffusione di specifici genotipi di HPV.

Tali caratteristiche dovrebbero essere sempre prese in considerazione nell'ambito della politica sanitaria (14), prima di promuovere ricerche epidemiologiche o vaccinazioni di massa, in quanto la distribuzione del virus o di vari genotipi è possibile che cambi da regione a regione, anche a seconda dei flussi migratori delle popolazioni (15).

Poiché la ricerca di uno o più genotipi sembra l'unica possibilità per mappare la distribuzione virale regionale, i programmi di screening dovrebbero basarsi su dati affidabili e reali, circa i genotipi maggiormente presenti, ottenibili, a questo punto con metodiche affidabili, quali, come detto il sequenziamento molecolare dell'HPV (16), un mezzo diagnostico altamente significativo per distinguere l'infezione da HPV da un singolo genotipo dall'infezione multipla.

CONCLUSIONI

Secondo l'analisi dei risultati del nostro studio, è stato possibile discriminare le infezioni virali a seconda dei vari genotipi di HPV presenti nel muco cervico-vaginale delle pazienti e, allo stesso tempo, avere un'ulteriore indicazione della presenza di ulteriori infezioni da altri genotipi. La comparazione fra le due tecniche, il sequenziamento e l'ibridazione molecolare, ha promosso la prima come la tecnica maggiormente affidabile e precisa e, quindi, "Gold Standard" nell'individuare eventuali episodi di co-infezione da due o più genotipi differenti.

TABELLA 4. Rapporto tra casi concordanti e casi non concordanti di mono-infezione da HPV realizzato attraverso il confronto tra il singolo genotipo analizzato con il sequenziamento e quello corrispondente identificato con apposite sonde molecolari

Infezioni singole da HPV	
<i>Casi concordanti fra sequenziamento e sonde molecolari</i>	<i>Casi discordanti fra sequenziamento e sonde molecolari</i>
90% (36/40)	10% (4/40)

TABELLA 5. Relazione tra casi concordanti e casi discordanti di infezione mista da HPV

31 casi di infezione mista da HPV. Confronto tra sequenziamento e sonde

<i>Casi concordanti fra sequenziamento e sonde molecolari</i>	<i>Casi discordanti fra sequenziamento e sonde molecolari (Infezioni miste non confermate dal sequenziamento)</i>
26% (8/31)	74% (23/31)

TABELLA 6. Casi non reali (non concordanti) di infezione multipla o co-infezione da HPV determinati dall'analisi del singolo genotipo identificato con il sequenziamento e quelli multipli ottenuti attraverso l'utilizzo di specifiche sonde molecolari

Casi non concordanti di infezioni miste da HPV Rapporto tra singolo genotipo analizzato con il sequenziamento e genotipi multipli rilevati con specifiche sonde molecolari	
<i>Sequenziamento</i>	<i>Sonde molecolari</i>
6	6; 51; 73; 89
6	6; 51; 73; 84
6	6; 39; 52/33/35/58
16	16; 51; 67
16	16; 66
18	18; 42; 54; 89
18	18; 83
31	31; 51; 89
31	31; 45; 61
31	31; 45; 54; 61
53	42; 53; 66
54	53; 54; 52/33/35/58
56	51; 54; 56; 89
58	18; 40; 54; 58; 83; 89
58	18; 26; 42; 58; 61; 52/33/35/58
59	54; 59
59	59; 89
61	31; 51; 61; 52/33/35/58
66	16; 59; 66
66	56; 66
70	42; 70
70	42; 70
84	55; 84

TABELLA 7. Infezioni da HPV: rapporto tra casi totali di concordanza e quelli di discordanza ottenuto dall'analisi combinata dei differenti genotipi di HPV attraverso il sequenziamento e l'utilizzo di specifiche sonde molecolari

Analisi 71 casi totali di infezione da HPV. Confronto tra casi concordanti e discordanti mediante differenza fra sequenziamento e sonde

**Casi totali concordanti
tra sequenziamento e sonde molecolari**
38% (27/71)

**Casi totali discordanti
tra sequenziamento e sonde molecolari**
62% (44/71)

Il sequenziamento molecolare dell'HPV rappresenta l'unica metodica capace di determinare l'effettiva sequenza nucleotidica del filamento di DNA virale con l'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.

BIBLIOGRAFIA

- zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*. 2002; 342-350
- Tinelli A, Vergara D, Leo G, Moschetti G, Pisanò M, Vergari U, Campobasso A, Doria G, Tinelli R, Malvasi A, Pitotti E, Ciannamea B, Megha M, Maffia M. Infezione da HPV (human papilloma virus): una panoramica attuale. *Rivista di Ostetricia, Ginecologia pratica e Medicina Perinatale* 2006; 21(1/2): 15-23
- Tinelli A, Vergara D, Leo G, Malvasi A, Casciaro S, Leo E, Montanari MR, Maffia M, Margigliante S, Lorusso V. Human papillomavirus genital infection in modern gynaecology: genetic and genomic aspects. *Eur Clinics Obstet Gynaecol* 2007; 3:1-6
- Tinelli A, Vergara D, Leo G, Vergari U, Tinelli R, Malvasi A. 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
- Tinelli A, Leo G, Guglielmo I, Pisanò M, Storelli F, Pitotti E, Galante MM, Vergara D, Tinelli R, Malvasi A, Guido M. Epidemiologia molecolare sull'HPV in una popolazione salentina a rischio nell'ultimo biennio. *Rivista di Ostetricia, Ginecologia pratica e Medicina Perinatale* 2008; 23 (2): 25-28
- De Francesco MA, Gargiulo F, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Manca N. Detection and genotyping of Human papillomavirus in cervical samples from Italian patients. *J Med Virol*. 2005; 75: 588-592.
- Burd EM. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16: 1-17
- Seme K, Fujs K, Kocjan BJ, Poljak M. Resolving repeatedly borderline results of Hybrid Capture 2 HPV DNA Test using polymerase chain reaction and genotyping. *J Virol Meth* 2006; 134:252-256
- Saini R, Shen TH, Santhanam J, Othman NH, Othman N, Hock TT. Comparison of DR. HPV Chip Kit with hybrid capture II assay for the detection of human papillomavirus in clinical samples: a preliminary study. *Trop Biomed* 2007; 24(1): 17-22
- Huang SL, Chao A, Hsueh S, Chao FY, Huang CC, Yang JE, Lin CY, Yan CC, Chou HH, Huang KG Wu TI et al. Comparison between the Hybrid Capture II Test and an SPF1/GP6 + PCR-Based Assay for Detection of Human Papillomavirus DNA in Cervical Swab Samples. *J Clin Microbiol*, May 2006:1733-1739
- Davies P, Arbyn M, Dillner J, Kitchener HC, Meijer CJ, Ronco G, Hakama M, A report on the current status of European research on the use of human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *Int. J. Cancer*. 2006; 118:791-796
- Choi YD, Jung WW, Nam JH, Choi HS, Park CS. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA Chip and sequencing. *Gynecol Oncol* 2005; 98:369-375
- Oh TJ, Kim CJ, Woo SK, Kim TS, Jeong DJ, Kim MS, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive DNA microarray for detection and genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2004 (Jul);42(7):3272-80
- Stanley M. Immune intervention in HPV infections: current progress and future developments. *Expert Rev Vaccines*. 2003; 2(5): 615-7
- 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
- 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