



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

SCUOLA DI DOTTORATO  
SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

DIPARTIMENTO  
SANITA' PUBBLICA-MICROBIOLOGIA-VIROLOGIA

CORSO DI DOTTORATO  
SANITA' PUBBLICA - XXIV CICLO

**EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELLE INFEZIONI DA HUMAN  
PAPILLOMAVIRUS (HPV) E *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* NELLA  
POPOLAZIONE GENERALE FEMMINILE**

(MED-42)

**Elena Rosanna Frati**  
Matricola n. R08009

TUTOR: Prof.ssa Elisabetta Tanzi

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Prof.ssa Mirella Pontello

A.A. 2010-2011

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	1
1.1 LE INFEZIONI A TRASMISSIONE SESSUALE	2
1.2 HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV)	7
1.3 L'INFEZIONE DA HPV	16
1.4 PATOLOGIE CORRELATE ALL'INFEZIONE DA HPV	22
1.5 VIE DI TRASMISSIONE	26
1.6 EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE DA HPV	27
1.7 METODI DIAGNOSTICI PER L'IDENTIFICAZIONE DELL'INFEZIONE DA HPV	32
1.8 STRATEGIE DI PREVENZIONE PER L'INFEZIONE DA HPV E PER L'INSORGENZA DEL TUMORE	37
1.9 TERAPIA DELLE LESIONI DA HPV	46
1.10 I GENOTIPI AD ALTO RISCHIO ONCOGENO: HPV-16 E HPV-18	48
1.11 <i>Chlamydia trachomatis</i>	55
1.12 L'INFEZIONE DA <i>Chlamydia trachomatis</i>	60
1.13 MANIFESTAZIONI CLINICHE DELL'INFEZIONE DA <i>Chlamydia trachomatis</i>	63
1.14 VIE DI TRASMISSIONE	65
1.15 EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE DA <i>Chlamydia trachomatis</i>	66
1.16 METODI DIAGNOSTICI PER L'IDENTIFICAZIONE DELL'INFEZIONE DA <i>Chlamydia trachomatis</i>	69
1.17 STRATEGIE DI PREVENZIONE DELL'INFEZIONE DA <i>Chlamydia trachomatis</i>	71
1.18 TERAPIA DELLE LESIONI DA <i>Chlamydia trachomatis</i>	73
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	74
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	77
3.1 POPOLAZIONE IN STUDIO	78

3.2	RACCOLTA, CONSERVAZIONE E ESTRAZIONE DI DNA DA CAMPIONI BIOLOGICI	80
3.3	DIAGNOSI DI INFEZIONE DA HPV E TIPIZZAZIONE VIRALE	83
3.4	DIAGNOSI DI INFEZIONE DA <i>Chlamydia trachomatis</i>	88
3.5	STUDIO DELLE VARIANTI GEOGRAFICHE IN LCR E DEGLI ESCAPE MUTANTS IN L1 DI HPV-16 E HPV-18	91
3.6	DETERMINAZIONE DEI SEROVAR DI <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	106
3.7	ANALISI STATISTICA	110
<b>4.</b>	<b>RISULTATI</b>	111
4.1	EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELLE INFEZIONI DA HPV E <i>Chlamydia trachomatis</i>	112
4.1.1	Prevalenza di infezione da HPV e caratterizzazione dei principali genotipi infettanti in donne della popolazione generale femminile (25-64 anni), normalmente afferenti a programmi di screening	112
4.1.2	Prevalenza di infezione da HPV e caratterizzazione dei principali genotipi circolanti in adolescenti/giovani donne (13-24 anni) sessualmente attive	124
4.1.3	Prevalenza di infezione da HPV e caratterizzazione dei principali genotipi infettanti in adolescenti/giovani donne sessualmente attive vaccinate con vaccino anti-HPV	132
4.1.4	Prevalenza di infezione da <i>Chlamydia trachomatis</i> in adolescenti/giovani donne (13-24 anni) sessualmente attive	135
4.2	SORVEGLIANZA MICROBIOLOGICA DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA HPV E <i>Chlamydia trachomatis</i> MEDIANTE ANALISI FILOGENETICA	137
4.2.1	Studio delle varianti geografiche e degli eventuali "escape mutants" dei genotipi ad alto rischio oncogeno HPV-16 e HPV-18 nella popolazione generale femminile (13-24 anni)	137
4.2.2	Valutazione dei principali serovar di <i>Chlamydia trachomatis</i> responsabili d'infezione nelle adolescenti/giovani donne (13-24 anni) sessualmente attive	146
4.3	VALUTAZIONE DELLE CO-INFEZIONI HPV/ <i>Chlamydia trachomatis</i> NELLE ADOLESCENTI/GIOVANI DONNE (13-24 ANNI) SESSUALMENTE ATTIVE	149
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	152
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	165
<b>7.</b>	<b>ABSTRACT</b>	179

# **1. INTRODUZIONE**

## 1.1. LE INFEZIONI A TRASMISSIONE SESSUALE

Le infezioni sessualmente trasmesse (IST) costituiscono un importante problema di Sanità Pubblica a livello mondiale. Si contraggono attraverso rapporti sessuali a rischio e molte di queste, se non trattate, possono portare a conseguenze potenzialmente pericolose per l'apparato genitale femminile e maschile.

Le infezioni sessualmente trasmesse, virali e batteriche, più diffuse comprendono: *gonorrea*, *sifilide*, herpes genitale, HIV, Human Papillomavirus (HPV) e *Chlamydia trachomatis*. La maggior parte di esse sono asintomatiche rendendo così difficile la diagnosi e quindi la successiva terapia. Per alcune la risoluzione avviene spontaneamente prima della manifestazione dei sintomi e quindi senza particolari conseguenze; per altre, invece, ci possono essere conseguenze che possono portare all'insorgenza di patologie piuttosto serie.

Esiste una notevole variabilità delle situazioni osservate nelle varie parti del mondo (aree geografiche, contesto urbano o rurale, stili di vita, scolarizzazione e lavoro, tradizioni culturali, familiari e religiose, età al momento del matrimonio, genere, condizioni socio-economiche) che possono influire sull'acquisizione e poi sulla storia naturale dell'infezione, ma è difficile analizzare questi dati, organizzati secondo criteri che li rendono difficilmente confrontabili.

Diversi sono i fattori che favoriscono la diffusione dell'infezione, tra cui la maggiore suscettibilità biologica delle donne in relazione alla struttura anatomica dell'apparato genitale, più complessa e maggiormente favorevole all'insediamento dei patogeni; l'immatunità dei tessuti genitali degli adolescenti; lo stato di grave deficienza immunitaria caratteristico dei soggetti con infezione da HIV. Anche il mancato utilizzo di contraccettivi barriera, quali il preservativo, rende gli adolescenti più esposti al rischio di contrarre infezioni sessualmente trasmissibili.

Una delle categorie a maggior rischio di contrarre infezioni sessualmente trasmissibili è proprio quella degli adolescenti/giovani adulti. Infatti, dei 448 milioni di nuovi casi annuali di IST, oltre il 75% si manifesta nella fascia d'età 15-49 anni [1]. Si stima, quindi, che ogni anno un adolescente su 20, e con età man mano sempre più bassa, contragga una IST. Nonostante ciò, esistono diverse barriere che limitano la possibilità di una gestione sanitaria adeguata di questo gruppo a

rischio. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ne individua sostanzialmente tre tipi [2]:

1. barriere legate al decorso spesso asintomatico delle infezioni e alla difficoltà di applicare le indagini diagnostiche;
2. barriere correlate alla scarsa informazione e consapevolezza della gravità delle IST;
3. barriere all'accesso ai servizi sanitari per ragioni sia economiche sia di organizzazione degli stessi rispetto alle esigenze degli adolescenti.

Il grado di conoscenza delle IST è risultato insufficiente in molte indagini. Molti adolescenti apprendono le informazioni su sessualità, riproduzione e contraccezione prevalentemente dai *media* e dai coetanei, mentre il contributo della famiglia è spesso carente.

Le informazioni sulle IST sono spesso trascurate e, in caso di malattia, l'adolescente rinuncia a ricorrere ai servizi sanitari. Centri sanitari dedicati agli adolescenti sono presenti fin dagli anni Sessanta in Europa e negli Stati Uniti e dagli anni Settanta anche nell'America latina, mentre sono comparsi solo negli anni Novanta in Africa e, in misura minore, in Asia e nei Paesi dell'ex Unione Sovietica [3].

In molti studi è segnalato un ritardo significativo, soprattutto da parte delle ragazze, e non privo di conseguenze sugli esiti dell'infezione, nel rivolgersi a un medico in caso di sintomi di IST.

Durante la gravidanza, le infezioni sessualmente trasmissibili non curate determinano infezioni congenite e perinatali specialmente nelle aree del mondo con tassi di infezione elevati e si associano ad aborto spontaneo, mortalità perinatale, parto pretermine ed endometrite *postpartum* [4]. Sono inoltre causa di anomalie congenite, congiuntivite (con possibile evoluzione in cecità), sordità, polmonite, encefaliti e meningiti a volte con danni neurologici permanenti, epatiti acute ed epatopatie [5].

La contrazione di un'infezione sessuale durante la gravidanza può avere conseguenze molto negative, anche letali, per il feto e la madre. Per esempio la sifilide precoce non curata (la cui prevalenza in Africa varia dal 4% al 15%) si associa a una mortalità fetale del 25% ed è responsabile del 14% dei decessi neonatali [6].

L'infezione da HPV può evolvere in cancro degli organi genitali esterni e soprattutto in quello della cervice uterina, che si risolve con l'asportazione parziale o totale del collo dell'utero; l'infezione da C.

*trachomatis* può causare gravi danni all'apparato genitale e essere responsabile di gravidanze extrauterine. Entrambe queste infezioni possono portare, quindi, a difficoltà a livello riproduttivo e a sterilità [7].

Secondo la *Global Strategy* dell'OMS, il coinvolgimento dei servizi sanitari, l'informazione sulle modalità di prevenzione, l'organizzazione di centri strutturati in base alle specifiche esigenze degli adolescenti e l'attenzione ai sottogruppi a rischio elevato sono indispensabili per attuare appropriati interventi di sorveglianza.

Negli Stati Uniti, i CDC (*Centre for Disease Control*) hanno attivato da tempo una sezione completamente dedicata alle malattie sessualmente trasmissibili che interessano in modo particolare alcune regioni e alcune categorie sociali della popolazione americana. La sezione, chiamata "*Division of sexually transmitted disease*", mantiene un sistema di sorveglianza annuale sull'andamento delle malattie e ha prodotto delle linee guida per la diagnosi e il trattamento [8].

In Europa, l'Ufficio regionale dell'OMS ha messo a punto una *task force* con il compito di rispondere efficacemente alle epidemie di IST nell'est Europa e in Asia centrale, epidemie che possono potenzialmente diventare un problema serio di salute per tutta la Regione europea. Le malattie sessualmente trasmissibili sono, infatti, tornate recentemente all'ordine del giorno dei sistemi sanitari europei, per l'elevata incidenza rilevata nei nuovi Paesi membri, quelli appartenenti all'ex blocco sovietico. Nonostante i dati siano variabili e dipendano in larga scala dai metodi di screening, secondo l'Ufficio regionale europeo dell'OMS, l'incidenza media delle IST nei Paesi dell'est europeo è in media 100 volte più alta rispetto ai Paesi occidentali.

Quasi tutti i Paesi europei hanno un sistema di sorveglianza delle IST, più del 90% ha cliniche specializzate, ma solo il 60% ha linee guida per la gestione e il trattamento. Nel 56% dei Paesi, i servizi relativi alle IST fanno parte delle cure primarie e solo il 30% ha un programma nazionale strutturato di controllo e trattamento. Per una risposta globale all'emergenza esiste una *task force* europea che sta cercando di stabilire le linee guida comuni per il controllo delle IST [9].

Dal 2009 l'ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) sta coordinando un sistema di sorveglianza delle IST che si sforza di garantire un'alta qualità dei dati provenienti da 30 Paesi dell'Unione Europea (EU) e dall'Area Economica Europea (EEA).

## **EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI A TRASMISSIONE SESSUALE**

Nel mondo, quasi un milione di persone contrae ogni giorno un'infezione sessualmente trasmissibile e dei 448 milioni di casi all'anno riscontrati, la maggior parte si verifica nell'Asia meridionale e sud-orientale, seguita dall'Africa sahariana e dall'America latina e caraibica [1, 2]. Nei Paesi occidentali, dalla fine degli anni '70 si è assistito da un lato a un progressivo aumento dell'incidenza delle IST provocate da virus (virus del papilloma umano, herpes genitale, virus dell'immunodeficienza umana) e, dall'altro, a una relativa riduzione delle IST classiche a prevalente eziologia batterica (sifilide, gonorrea, linfogranuloma venereo) [10, 11]. Purtroppo questo andamento si è bruscamente modificato subito dopo il 2000, quando, insieme al persistente aumento delle IST di origine virale, si è assistito anche all'aumento delle IST causate da agenti batterici. Ciò è stato attribuito in parte a cambiamenti nel comportamento sessuale delle popolazioni più a rischio ma anche al miglioramento e all'ottimizzazione delle tecniche diagnostiche oltre all'introduzione in alcuni Paesi di programmi di screening che hanno permesso di identificare anche quelle infezioni silenti che fino ad allora passavano inosservate. Dai dati sugli oltre 95 mila nuovi casi di IST raccolti fino al 31 dicembre 2004 emerge che oltre il 90% dei pazienti si dichiara eterosessuale, che oltre il 40% dei pazienti sono donne e che un paziente su cinque (21,4%) ha già contratto IST in passato [12]. Gli andamenti delle singole malattie mostrano una generale stabilità del numero dei casi nel tempo, fatta eccezione per la sifilide infettiva e in misura minore per la gonorrea, che dal 2000 al 2004 mostrano un aumento del numero dei malati [11].

In Europa le infezioni sessualmente trasmissibili rappresentano le forme infettive più diffuse dopo quelle respiratorie. L'epidemiologia delle IST differisce tra le regioni occidentali, dove l'incidenza è in declino, e quelle orientali insieme all'Asia centrale, dove vi è uno spiccato aumento [10, 12]. Nel 2009, nel Regno Unito, sono state effettuate oltre 482 mila nuove diagnosi di IST, 12 mila in più rispetto a quelle effettuate nel 2008. L'aumento delle nuove infezioni per il 2009 è in linea con il trend positivo che ha caratterizzato gli ultimi dieci anni e la fascia d'età più a rischio di contagio risulta essere quella compresa tra i 19 e i 20 anni per gli uomini e tra i 20 e i 23 anni per le donne [13].

Negli Stati Uniti cinque tra le prime dieci infezioni per numero di casi sono riferibili ad infezioni sessualmente trasmissibili [14, 15]. I CDC di Atlanta stimano un'incidenza di circa 19 milioni di casi all'anno, circa la metà dei quali a insorgenza nella fascia d'età dai 15 ai 24 anni [16]. Le più frequenti sono le infezioni da *C. trachomatis* e la gonorrea, rispettivamente circa 1.100.000 e 355.000 casi nel 2007 [17]. In Italia, la diffusione delle infezioni sessualmente trasmissibili è valutata da un sistema di sorveglianza passiva dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), sulla base delle diagnosi effettuate da una rete di 48 centri specialistici pubblici che coprono adeguatamente il territorio nazionale [18]. Le patologie monitorate sono la sifilide, la gonorrea, le infezioni gonococciche non clamidiali, l'infezione da *C. trachomatis*, l'herpes ano-genitale, la condilomatosi ano-genitale, il linfogranuloma venereo, il granuloma inguinale.

## 1.2. HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV)

I Papillomavirus (PV) sono un gruppo di virus a DNA capaci di indurre la proliferazione delle cellule epiteliali portando a lesioni benigne della pelle (le verruche) e delle mucose (i condilomi) nei loro ospiti naturali: mammiferi e uccelli. Alcuni PVs, inoltre, sono implicati nello sviluppo di lesioni maligne epiteliali [19, 20].

### **CLASSIFICAZIONE**

I Papillomavirus rappresentano un diversificato e ampio gruppo di virus a tropismo epiteliale che infettano mammiferi e uccelli.

Studi filogenetici attribuiscono a questi virus un'origine molto antica, parallela a quella delle prime specie di vertebrati. Sembrano, infatti, aver infettato l'uomo sin dall'origine evolvendosi con esso [21].

Come tutti i virus a DNA i PV sono dotati di una maggior stabilità genetica dovuta sia all'attività di *proofreading* della DNA polimerasi sia al lento processo di replicazione del virus contemporaneo alla divisione delle cellule ospiti che limita il numero di modificazioni all'interno del genoma dovute a mutazioni, delezioni, inserzioni [22].

Sebbene i primi tipi di PV sono stati isolati 30 anni fa [23], la difficoltà di trovare appropriati sistemi di coltura cellulare per propagare questi virus ha impedito il progredire degli studi sulle funzioni virali e ha limitato lo stabilirsi di una tassonomia basata sulle proprietà biologiche.

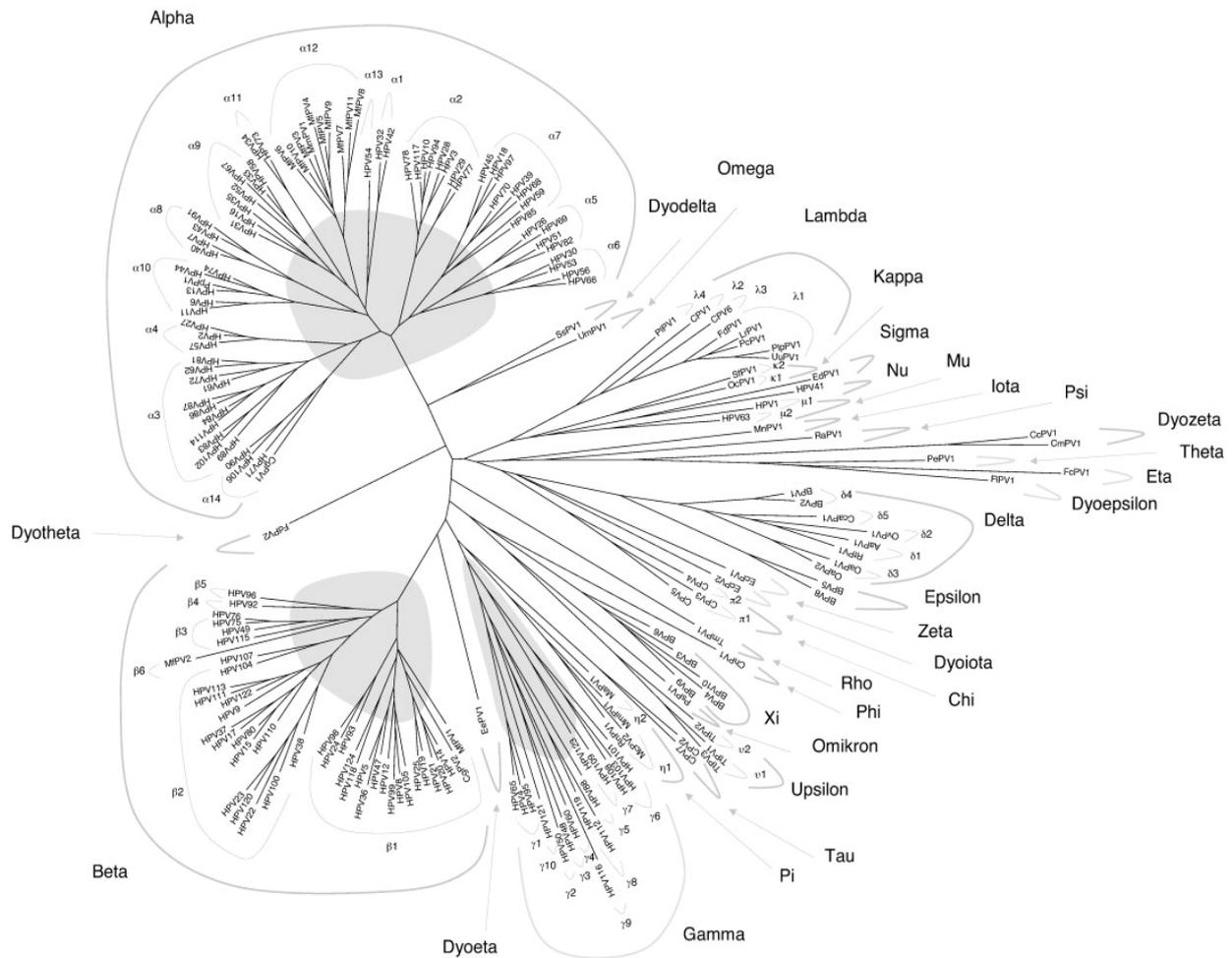
Dalla seconda metà degli anni '50 i PV venivano classificati, insieme ai poliomavirus, nella famiglia delle *Papovaviridae*, sulla base della loro similarità di struttura, delle caratteristiche genomiche (DNA circolare a doppia elica) e sull'assenza di un *envelope* lipoproteico. Solo agli inizi degli anni '80 alcuni studi dimostrarono che queste similarità erano troppo superficiali per stabilire una relazione tra le due classi di virus. Si scoprì, inoltre, che i due gruppi di virus presentavano una differente dimensione del genoma, un'organizzazione genomica completamente diversa e non possedevano nessuna similarità di sequenza nucleotidica o amminoacidica, così nel 2002 la Commissione Internazionale di Tassonomia dei Virus (*International Committee Taxonomy of Viruses*, ICTV) decise di separare i due gruppi in due famiglie distinte, *Polyomaviridae* e *Papillomaviridae* [24].

Questo progresso nella tassonomia ha portato ad un miglioramento e non ad una contraddizione del precedente sistema tassonomico. La designazione "HPV" (Human Papillomavirus), seguita da un numero corrispondente al genotipo virale, viene attribuita infatti solo dopo isolamento e caratterizzazione dell'intero genoma di ogni presunto virus in grado di infettare l'uomo.

L'attuale sistema tassonomico è ampiamente accettato e ha 3 obiettivi: 1) investigare la relazione tra classificazione tassonomica e proprietà biologiche e patologiche del virus; 2) stabilire una relazione tra i diversi tipi di PV; 3) comparare il termine "tipo" con quelli di genere e specie usati spesso nella sistematica di tutti gli organismi biologici.

Nel 2009 lo IARC (*International Agency for Cancer Research*), sulla base dello studio dell'intero genoma, ha descritto 189 genotipi di Papillomavirus. Di questi, 120 sono virus a tropismo umano (*Human Papillomavirus*, HPV), 64 infettano mammiferi non-umani (conigli, cani, gatti, cavalli), 3 gli uccelli e 2 i rettili (Figura 1) [25].

L'uso di algoritmi filogenetici, in grado di comparare sequenze genomiche multiple, ha permesso di suddividere i tipi di Papillomavirus in 29 generi (dal genere *AlphaPapillomavirus* al genere *DyoiotaPapillomavirus*) [26] sulla base della percentuale di similarità a livello della sequenza nucleotidica dell'ORF L1 del genoma virale. Gli HPV umani appartengono a 5 di questi generi: *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* e *Nu*.



**Figura 1.** Albero filogenetico costruito dalle sequenze nucleotidiche L1 dei 189 Papillomavirus (Bernard et al., Virology 2010, 70-79).

Ogni genere è suddiviso in diverse specie che raggruppano sequenze con una similarità compresa tra il 60% e il 70%; all'interno di ogni specie si trovano i *genotipi* (o *tipi*) con una similarità di sequenza tra di loro compresa tra il 71% e l'89%. Si distinguono, fra questi ultimi, i *sottotipi*, con similarità del 90-98%, e le *varianti*, che differiscono solo per l'1-2% a livello della sequenza genomica L1.

Si è potuto constatare che i generi raggruppano specie imparentate filogeneticamente, mentre le specie comprendono tipi che possono avere in comune proprietà biologiche e patologiche [25].

I Papillomavirus umani sono suddivisi in genotipi "cutanei", che infettano l'epitelio cheratinizzato, ed in genotipi "mucosali", che infettano l'epitelio mucosale del tratto ano-genitale, del tratto urinario, della cavità orale e del tratto respiratorio [27].

Di tutti gli HPV che infettano l'uomo, circa 40 (il 34% di tutti i tipi di HPV identificati) sono risultati associati a patologie del tratto ano-genitale. Questi sono trasmessi prevalentemente per via sessuale e associati ad un ampio spettro di patologie sia benigne che maligne.

### **MORFOLOGIA E STRUTTURA**

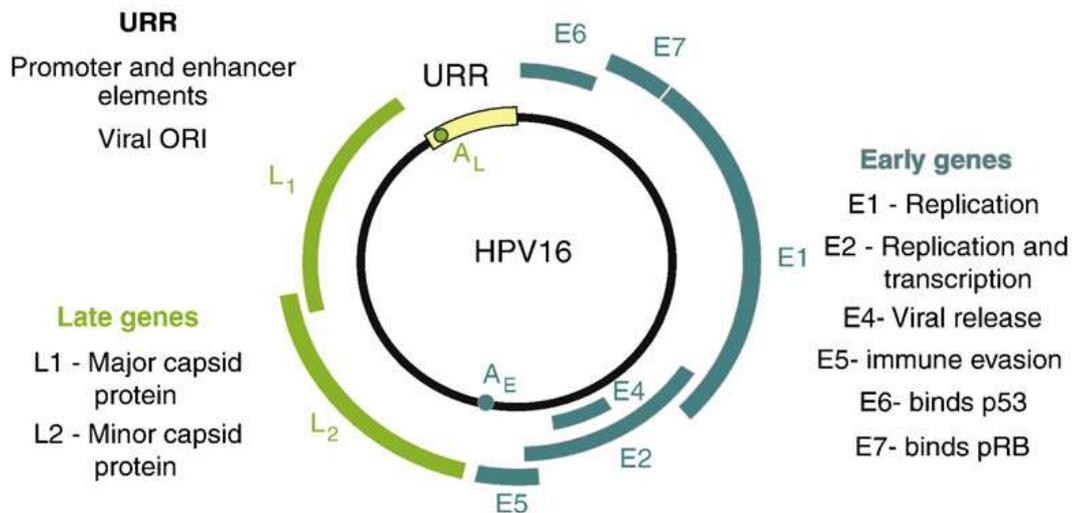
La particella virale è costituita da un genoma circolare contenente i geni necessari per la replicazione ed è rivestita da un capsido proteico a geometria icosaedrica, privo di *envelope*, formato dal ripetersi di due proteine (L1 e L2), per una dimensione di circa 55 nanometri. L'assenza dell'*envelope* lipoproteico giustifica la sua resistenza al calore ed ai solventi organici. Il capsido è composto da 360 copie della proteina L1 (proteina maggiore del capsido) del peso molecolare di circa 55 KD e da 12 copie della proteina L2 (proteina minore) del peso molecolare di circa 70 KD, organizzate in 72 capsomeri (60 esavalenti e 12 pentavalenti) [28].

### **GENOMA**

Il genoma di HPV è costituito da una singola molecola di DNA a doppia elica circolare di circa 8 Kb ed è possibile individuare almeno 8 *Open Reading Frames* (ORF) (Figura 2)[19].

Il genoma virale può essere suddiviso in tre regioni:

- una regione precoce "*Early*" di circa 4 Kb contenente 6 ORFs codificanti per 6 proteine funzionali (E1, E2, E4, E5, E6, E7) coinvolte nella replicazione, nella trascrizione e nella trasformazione cellulare ed espresse durante la fase non produttiva del virus;
- una regione tardiva "*Late*" di circa 3 Kb contenente 2 ORFs codificanti per altrettante proteine strutturali capsidiche (L1 ed L2) ed espresse nella fase produttiva dell'infezione [29].
- una regione di controllo denominata LCR (*Long Region Control*) non codificante di circa 1 Kb contenente gli elementi regolatori per la trascrizione e la replicazione virale [30, 31].



HPV = human papillomavirus; URR = upstream regulatory region; ORI = origin of replication; pRB = retinoblastoma protein.

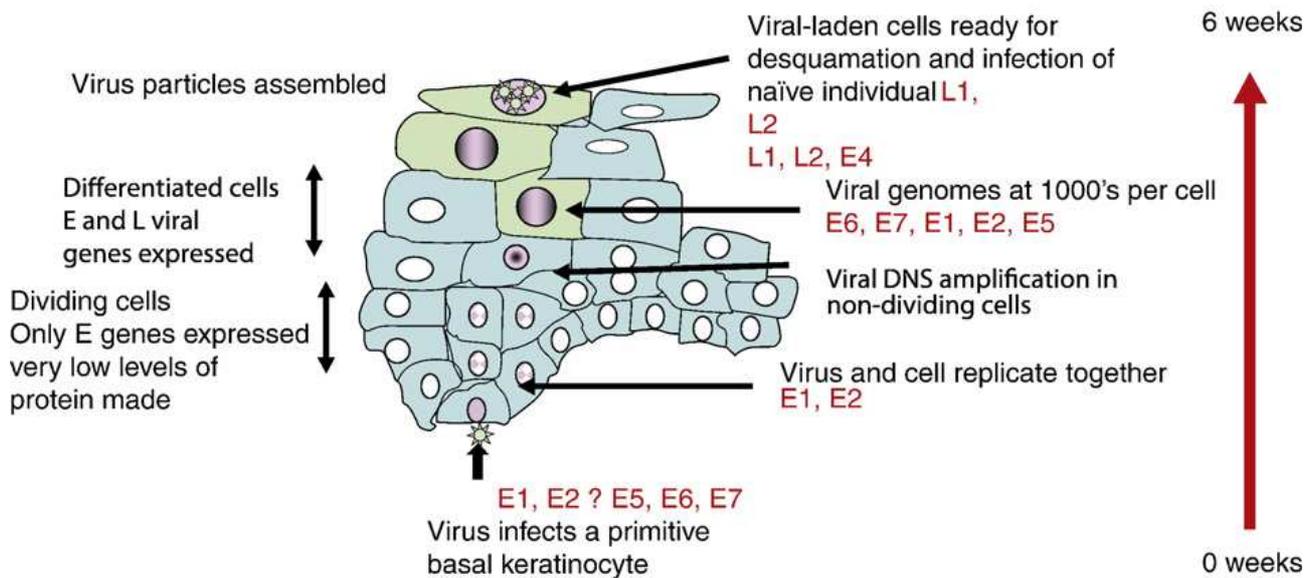
**Figura 2:** Rappresentazione schematica del genoma dell'HPV (M. Stanley, *Gynecologic Oncology* 117 (2010); S5-S10).

### CICLO REPLICATIVO

HPV ha un tropismo molto ristretto ed infetta solo le cellule epiteliali in differenziamento della cute o delle mucose, a seconda del genotipo considerato. Il **ciclo replicativo** si suddivide in stadi precoci e tardivi correlati al programma di differenziamento delle cellule epiteliali [32, 33].

Poiché le cellule basali degli epiteli pavimentosi sono le uniche cellule capaci di dividersi, il virus deve necessariamente infettare queste cellule per indurre una lesione persistente [19]. Attraverso microlesioni della pelle o delle mucose il virus arriva a livello dello strato basale dell'epitelio dove lega l'integrina alpha6 sulla superficie cellulare [34]. Tuttavia, si è constatato che questo legame non è strettamente necessario poiché l'HPV può infettare anche le cellule che non esprimono questo recettore [35].

In Figura 3 è schematizzato il ciclo replicativo di un HR-HPV.



Exclusively intraepithelial infectious cycle no cytolysis or death, no viraemia, long infectious cycle

**Figura 3:** Ciclo replicativo di un HR-HPV (M. Stanley, *Gynecologic Oncology* 117 (2010); S5-S10).

Il virus entra per endocitosi nella cellula, perde il suo involucro proteico, quindi il genoma virale raggiunge il nucleo e vi si stabilisce in forma episomale. In questa fase vengono espressi solo alcuni geni precoci (E1, E2) e il DNA virale si replica come un plasmide nucleare a copie multiple, inizialmente amplificandosi dalle 50 alle 100 copie; in seguito, ogni copia si replica una sola volta per ciascun ciclo di replicazione cellulare in sincronia con i cromosomi della cellula ospite durante la fase S e si ha una ripartizione equa dei genomi virali tra le cellule figlie. La replicazione genomica virale di tipo plasmidica è responsabile di un'infezione persistente e latente delle cellule basali dell'epitelio [19, 33, 36, 37].

Quando la cellula epiteliale inizia il programma di differenziamento e si sposta nello strato spinoso dell'epitelio, cominciano ad essere trascritti gli altri geni precoci (E5, E6 ed E7) con produzione delle rispettive proteine; successivamente si ha la trascrizione, oltre che del gene E4, dei geni tardivi L1 e L2, con conseguente produzione delle proteine strutturali. Nelle cellule dello strato granuloso inizia un'intensa replicazione del DNA virale di tipo vegetativa: il numero di copie del genoma virale aumenta in modo rilevante, fino a migliaia di copie per cellula, nonostante sia assente la sintesi del DNA cellulare [19, 33, 36].

Nelle cellule completamente differenziate degli strati più superficiali dell'epitelio i genomi della progenie virale vengono incapsidati e si ha formazione di particelle virali infettive che vengono rilasciate all'esterno sfruttando il *turnover* delle cellule superficiali dell'epitelio: si verifica quindi un'infezione produttiva [19, 36]. Questo stretto legame tra stadio di differenziamento del cheratinocita e livello di replicazione ed espressione del genoma virale è dovuto alla presenza, o meno, di fattori cellulari di controllo e di fattori virali come E1 ed E2 [30].

### **TRASCRIZIONE DEI GENI VIRALI E PATOGENESI DELL'INFEZIONE**

La **trascrizione dei geni virali** è complessa; infatti, è controllata da più promotori, e presenta processi di *splicing* multipli ed alternativi oltre che produzione diversificata di mRNA in cellule epiteliali a diverso stadio di differenziamento [19].

Nelle cellule epiteliali indifferenziate dello strato basale, P<sub>97</sub> è il promotore maggiormente attivo e controlla l'espressione dei geni precoci E1, E2, E5, E6 ed E7. L'espressione del gene E4, dei geni tardivi L1 e L2 e l'aumento del livello di espressione del gene E1 sono, invece, sotto il controllo del promotore tardivo P<sub>742</sub> che si attiva nelle cellule epiteliali completamente differenziate dello strato granuloso [38].

La trascrizione è regolata dallo stadio di differenziamento della cellula epiteliale infettata; questo è stato dimostrato osservando l'espressione differenziale di mRNA virali nelle cellule dei diversi strati di epiteli con verruche [39] ed inoltre è stato verificato *in vitro* con l'analisi di cheratinociti infettati, usando delle colture cellulari organotropiche capaci di mimare la struttura dell'epidermide e il differenziamento cellulare [40].

Il genoma dei Papillomavirus contiene molti elementi regolatori in *cis* ed alcune sue regioni codificano per diversi fattori trascrizionali che modulano l'espressione dei geni virali. La regione regolatrice **LCR** contiene elementi *enhancer*, responsivi a fattori virali (E1 ed E2) e cellulari (AP-1, NF1) [31] che hanno specificità di tessuto e di tipo cellulare. I suddetti elementi sono essenziali per l'inizio dell'espressione genica virale e per il mantenimento della latenza [41].

Il prodotto del gene **E2** è un importante regolatore della trascrizione virale. A seconda di dove sono posizionati i suoi siti di legame, a livello di *enhancer* o di promotori, la proteina **E2** può fungere da

attivatore trascrizionale dei geni precoci legando elementi responsivi a livello della regione **LCR** [42], oppure da repressore trascrizionale modulando negativamente la trascrizione dei geni **E6** ed **E7** [43]. Tale proteina ha anche un ruolo cruciale nella replicazione del DNA virale poiché si associa alla proteina **E1** e le permette di riconoscere e di legare con alta affinità l'origine di replicazione [44].

I geni **L1** ed **L2** sono sotto il controllo del promotore tardivo  $P_{742}$  che si attiva in modo specifico nei cheratinociti completamente differenziati; per tale ragione la trascrizione di questi geni e la produzione delle rispettive proteine si ha solo negli strati più superficiali dell'epitelio [45].

L'espressione dei geni **L1** e **L2** è inoltre regolata a livello post-trascrizionale: nella regione 3'-UTR (*UnTranslated Region*) degli mRNA tardivi ci sono delle sequenze di splicing inusuali riconosciute da specifici fattori cellulari, il cui legame riduce la stabilità degli mRNA stessi [46, 47]. La presenza o meno di questi fattori cellulari nelle varie tappe di differenziamento cellulare determinerà la persistenza o meno degli mRNA virali.

Il promotore tardivo  $P_{742}$  del genoma virale controlla anche la trascrizione del gene **E4**, nonostante quest'ultimo sia localizzato nella regione precoce del genoma [48]. Una volta avvenuta la trascrizione del gene **E4**, la traduzione dell'RNA messaggero porta alla produzione di una proteina in grado di legarsi al citoscheletro inducendone il collasso e contribuendo così alla liberazione della progenie virale [49].

Il ciclo replicativo completo del virus, con produzione di progenie virale matura, è tipico delle infezioni con genotipi di HPV a basso rischio (Low Risk, LR-HPV) oncogeno. In questo caso il genoma virale rimane in forma episomica nella cellula infettata ed il prodotto del gene **E5** gioca un ruolo importante nell'alterare la funzionalità cellulare. La proteina **E5** modifica la risposta cellulare a fattori di crescita e di differenziamento, inducendo così la sintesi del DNA e la proliferazione cellulare con contemporanea perdita delle capacità di differenziamento [36]. Questi eventi portano all'insorgenza di papillomi benigni a livello della cute (verruche) o delle mucose (condilomi) e di lesioni pre-neoplastiche a livello dell'area ano-genitale [19].

Nelle infezioni con genotipi di HPV ad alto rischio (High Risk, HR-HPV) oncogeno, invece, il genoma virale si integra in quello della cellula ospite con conseguente mancanza di produzione di una progenie virale

completa; tale integrazione è determinante nell'induzione e nel mantenimento di un fenotipo cellulare trasformato [50]. Sebbene il sito di integrazione nei cromosomi sia casuale, quello in cui il DNA virale viene interrotto ricorre all'interno della ORF E2. L'assenza della proteina E2, che normalmente inibisce la trascrizione dei geni precoci E6 ed E7, comporta un aumento dell'espressione delle proteine virali E6 ed E7, risultando così coinvolte nella patogenesi di neoplasie. Le proteine E6 ed E7, infatti, si legano e inattivano i prodotti di due importanti geni oncosoppressori, p53 e pRb, proteine cellulari ad attività anti-oncogena.

La cellula infetta sopravvive più a lungo, mantenendo la capacità proliferativa e la tendenza a sviluppare e perpetuare mutazioni nel DNA. La proteina E6 lega p53 e ne facilita la degradazione, quindi vengono inibite le funzioni oncosoppressive di p53, quali l'arresto del ciclo cellulare in fase G1, la riparazione del DNA danneggiato e l'induzione dell'apoptosi delle cellule irrimediabilmente danneggiate [51].

La proteina E7 si lega alla forma ipofosforilata di pRb che normalmente sequestra i fattori di trascrizione E2F. Pertanto, la proteina pRb non è più in grado di legare tali fattori di trascrizione e quindi di svolgere la sua funzione di freno alla progressione del ciclo cellulare. I fattori E2F sono quindi liberi di indurre la trascrizione dei geni necessari all'ingresso nella fase S, indipendentemente dalla presenza di fattori di crescita quali l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) e il PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) [52].

### **1.3. L'INFEZIONE DA HPV**

#### **STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE E FATTORI DI RISCHIO**

Comunemente il virus penetra nelle cellule attraverso microlesioni o piccole abrasioni in via di guarigione. Ciò spiegherebbe il motivo per cui le aree genitali, soggette a traumi dovuti a rapporti sessuali, siano le sedi predilette per lo sviluppo di lesioni riconducibili ad HPV.

L'infezione è generalmente transitoria: il virus viene cioè eliminato dal sistema immunitario prima di produrre qualsiasi effetto patogeno. Si stima che l'80% circa della popolazione sessualmente attiva contragga l'infezione almeno una volta nell'arco della vita [53-55], con un picco di prevalenza nelle giovani donne fino a 25 anni d'età [56]. L'infezione regredisce spontaneamente in un anno nel 50% circa dei casi e in due anni nell'80% circa dei casi. Il tempo necessario all'eliminazione è dovuto al fatto che il virus rende difficile il proprio riconoscimento da parte dei meccanismi di difesa immunitaria che sono legati all'immunità cellulare (linfociti T) piuttosto che all'immunità umorale (linfociti B).

La persistenza dell'infezione è la condizione necessaria perché il virus esplichi un'azione trasformante sull'epitelio: i virus a maggior potere oncogeno sono quelli a maggiore persistenza. In questo caso possono manifestarsi lesioni precancerose che possono progredire a cancro della cervice. Generalmente assume il significato di "infezione persistente" la positività a due o più test consecutivi in un determinato arco di tempo. Da questo approccio discende che il significato di persistenza è arbitrario poiché varia in base all'intervallo tra i test, con dati di letteratura [57, 58] che presentano intervalli tra i due mesi e i sette anni (con una mediana di 6 mesi). L'arbitrarietà di questa definizione dipende, oltre che dall'intervallo tra i test, dal fatto che non si conosca la storia naturale dell'infezione rispetto al momento in cui viene eseguito il test. Una stima più realistica dovrebbe basarsi su studi che prendono in considerazione solo infezioni incidenti. Considerando la difficoltà di una definizione temporale univoca di persistenza, il concetto andrebbe modificato come tempo di esposizione dell'epitelio al virus ad alto rischio sufficiente a iniziare un'azione oncogena. L'altra possibile debolezza di una rilevazione di persistenza è il reale significato di un test negativo, cioè di reale eliminazione del virus, di una presenza quantitativamente non rilevabile con uno specifico

metodo o di passaggio a uno stato di latenza dal quale può riapparire successivamente.

Complessivamente l'elevata prevalenza e la breve durata della maggior parte dei casi indicano che l'infezione da HPV è un evento estremamente comune e, nella grande maggioranza dei casi, privo di conseguenze. Però, sebbene avvenga raramente, gli studi sulla storia naturale del carcinoma della cervice uterina hanno mostrato che l'infezione da tipi di HPV oncogeni può portare allo sviluppo di lesioni intraepiteliali di basso ed alto grado. Le lesioni di alto grado se non trattate possono progredire verso il cervicocarcinoma.

L'infezione con il virus rappresenta la causa necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo del tumore della cervice uterina [59]. Altri cofattori sono necessari per la persistenza dell'infezione e la progressione verso lesioni neoplastiche.

I fattori che determinano la transizione da infezione latente ad infezione subclinica sono ignoti, benché alla base vi siano complesse interazioni tra ospite, virus ed agenti ambientali.

Le lesioni displastiche sono più frequentemente localizzate in prossimità della giunzione squamo-colonnare, la zona della cervice uterina di transizione tra l'epitelio squamoso che riveste l'esocervice, le pareti vaginali e l'epitelio colonnare che riveste l'endocervice. A conferma dell'importanza della giunzione sta il fatto che le infezioni da HPV di tipo oncogeno sono rilevate in maniera pressoché simile in campioni vaginali e cervicali, eppure il cancro cervicale è il secondo tumore femminile a livello mondiale, mentre il tumore della vagina rimane più raro [60].

Nonostante ciò meno dell'1% delle donne con un'infezione persistente con un genotipo dell'HR-clade sviluppa un tumore cervicale dopo un intervallo medio di 15 anni [61].

Nel 2011 l'Agenzia Internazionale della Ricerca sul Cancro (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) ha stabilito la nuova classificazione degli HPV mucosali-genitali valutata non solo in rapporto al grado di lesione intraepiteliale squamosa (*Squamous Intraepithelial Lesion, SIL*) e al grado di alterazioni neoplastica intraepiteliale cervicale (*Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN*) predisponente allo sviluppo del tumore maligno, ma anche tenendo in considerazione la similarità genetica fra i diversi genotipi di HPV (Tabella 1)[62].

<b>HPV: nuova classificazione (IARC 2011)</b>			
<b>HR-clade</b>	<b>Gruppo 1</b>	<b>Cancerogeni per l'uomo</b>	<b>16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59</b>
	<b>Gruppo 2A</b>	<b>Probabilmente cancerogeni per l'uomo</b>	<b>68</b>
	<b>Gruppo 2B</b>	<b>Possibilmente cancerogeni per l'uomo</b>	<b>26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97</b>
<b>LR</b>	<b>Gruppo 3</b>	<b>Non classificabili come cancerogeni per l'uomo</b>	<b>6, 11, 28, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 62, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 86, 87, 89</b>

**Tabella 1:** Nuova classificazione IARC dei genotipi di Papillomavirus umani mucosali secondo il loro rischio oncogeno (IARC Monography 100B, 2011).

Persone che si infettano con genotipi virali dell'HR-clade e che non riescono ad eliminare il virus entro alcuni mesi dal contagio, sviluppano un'infezione subclinica produttiva, in cui il virus è in grado di replicarsi indipendentemente dalla divisione cellulare. Essa si manifesta con coilocitosi, atipia nucleare e comparsa di lesioni polimorfiche a carico del tratto genitale inferiore, la cui diagnosi richiede un'indagine citologica e/o endoscopica. Nella maggior parte dei casi si tratta di patologie benigne non associate allo sviluppo di forme tumorali gravi. Dopo circa 3 mesi dall'inizio dell'infezione produttiva, si assiste all'insorgere di una risposta immunitaria: in circa il 20-30% degli individui infetti si ha remissione, nel 60% remissione clinica e nel restante 20% si nota una certa refrattarietà all'attacco immune. Dopo circa 9 mesi si può osservare o la remissione dell'infezione, oppure un peggioramento delle lesioni HPV-correlate dovuto alla persistenza del virus nella cellula ospite. La persistenza dell'infezione, infatti, aumenta notevolmente il rischio di sviluppare una neoplasia. Nelle fasi tardive dell'infezione, può verificarsi l'integrazione del DNA virale nel genoma dell'ospite; tale processo determina l'espressione costitutiva delle oncoproteine E6 ed E7, dovuta alla mancata regolazione di E2, perso nell'integrazione, risultante nell'alterazione del ciclo cellulare e nell'instabilità genomica.

Persistenza e progressione virale sono state prevalentemente associate a due componenti: il tipo di HPV, ed in particolare le proprietà

intrinseche delle sue proteine oncogene E6/E7 di interagire con gli oncosoppressori p53/pRb e le proprietà dei genotipi virali di evadere la risposta immunitaria.

La maggiore attività oncogena dei genotipi ad alto rischio è correlata alla maggiore efficienza delle proteine virali di legare e frammentare le proteine oncosoppressive p53 e pRb, che di norma, inibendo le chinasi ciclina-dipendenti, rallentano il ciclo cellulare in corso di danno genotossico permettendo in una fase G1 prolungata la riparazione del DNA prima della sua replicazione. La rimozione/riduzione del pool intracellulare degli oncosoppressori comporta l'accumulo di mutazioni e alterazioni genomiche con graduale progressione neoplastica [51].

In relazione invece alla capacità dei tipi virali ad alto rischio di evadere il sistema immunitario, i geni virali E6 e E7 stimolano le cellule epiteliali capaci di sopprimere la risposta immune locale; inoltre il virus ha imparato ad esprimere i suoi geni solo nelle cellule terminali differenziate che hanno finito di dividersi. Di conseguenza, le proteine virali sono espresse in grandi quantità solo nelle cellule superficiali dell'epitelio, mentre le cellule negli strati più profondi esprimono solo bassi livelli di geni virali. Questo meccanismo di replicazione permette al virus di nascondere se stesso, usando i normali meccanismi di differenziazione dell'epitelio infettato e rende difficile l'induzione di un'efficiente e durevole risposta immunitaria all'iniziale infezione virale. Per questo motivo, un'infezione pregressa con un tipo di HPV ad alto rischio potrebbe non garantire l'immunità nei confronti di un'infezione successiva [56].

#### **FATTORI DI RISCHIO CHE INTERVENGONO PER L'ACQUISIZIONE DELL'INFEZIONE**

I fattori di rischio che intervengono a livello dell'acquisizione dell'infezione sono per lo più legati ai comportamenti dell'ospite. Questi comprendono i comportamenti sessuali (età di esordio, elevato numero di partner e promiscuità sessuale), i livelli di igiene, il livello di istruzione, l'utilizzo o meno del preservativo, la circoncisione.

Il contatto sessuale con un partner infetto e la presenza di microlesioni nella mucosa o nella cute sono elementi necessari per la trasmissione. È quindi presumibile che l'elevato numero di partner e la promiscuità sessuale incrementino il rischio di contagio [63, 64].

L'uso del preservativo, anche se non garantisce una completa protezione da tutte le infezioni, sembra diminuire il rischio di trasmissione e di conseguenza ridurre le lesioni HPV correlate e le infezioni persistenti [65].

È stato ipotizzato che anche la circoncisione riduca il rischio di acquisizione di HPV [66].

#### **FATTORI DI RISCHIO COINVOLTI NELL'EVOLUZIONE DELLA PATOLOGIA**

I fattori di rischio coinvolti nell'evoluzione della patologia sono l'efficienza della risposta immunitaria dell'ospite, la suscettibilità genetica e le caratteristiche del virus infettante.

Per quanto riguarda le caratteristiche del virus, queste comprendono il tipo di virus infettante, la presenza di infezioni multiple, la presenza di varianti maggiormente oncogeniche, la carica virale e l'integrazione nel genoma dell'ospite.

Esistono anche dei co-fattori correlati allo sviluppo delle neoplasie ano-genitali quali l'alcool, il fumo, la presenza di co-infezioni con altri agenti patogeni e l'immunodepressione [63, 64].

Il fumo viene considerato un fattore predisponente per le neoplasie ano-genitali [67] in quanto derivati nicotinici (contenenti sostanze cancerogene) sono stati rinvenuti a livello delle mucose [68], ed è ormai noto che il tabacco riduce le funzioni del sistema immunitario contribuendo al processo di cancerogenesi.

Il rischio di infezione aumenta in presenza di co-infezioni con altri agenti infettivi quali Herpes Simplex Virus, *Chlamydia trachomatis*, *Pneumocystis jiroveci*, *Candida spp* e Molluscum contagiosum virus [69, 70]. I soggetti infettati con il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) sono particolarmente suscettibili a tale infezione. In aggiunta, la precarietà del sistema immunitario può determinare l'instaurarsi di un'infezione persistente, come risultato di una mancata guarigione di un'infezione primaria. Pertanto, nei soggetti sieropositivi, sia a seguito dell'infezione da tipi virali di HR-HPV (in particolare HPV-16), sia a causa della compromissione dell'immunità cellulo-mediata, il rischio di sviluppare neoplasie risulta 5 volte maggiore rispetto alla popolazione HIV-negativa.

## **ASPETTI IMMUNOLOGICI**

La trasmissione mucosale del Papillomavirus umano da persona a persona e la successiva diffusione locale da cellula a cellula durante i normali processi di desquamazione (senza effetto citopatico o lisi cellulare) rendono complesso il contenimento immunologico delle infezioni e modesto il ruolo dell'immunità umorale; pertanto è prevalentemente la risposta cellulare a determinare un contenimento efficace dell'infezione e delle lesioni displastiche/neoplastiche ad essa associate.

L'immunità cellulo-mediata è importante per eliminare le cellule infette e per la generazione della memoria immunitaria. Pertanto è associata con la regressione della lesione e la protezione contro un'ulteriore infezione con lo stesso genotipo. Particolarmente rilevante è l'immunità cellulo-mediata diretta contro i prodotti degli oncogeni virali E6 e E7, la cui espressione è responsabile delle lesioni croniche che evolvono verso il carcinoma cervicale [71, 72].

L'efficacia della risposta immunitaria cellulo-mediata è influenzata da diversi parametri, tra cui la carica virale, il genotipo infettante e le caratteristiche dell'ospite.

La risposta umorale anticorpale elimina le particelle virali libere, prevenendo l'ancoraggio del virus alle cellule epiteliali. È principalmente diretta contro gli epitopi conformazionali della proteina maggiore del capsido, L1, presenti sulla superficie esterna della particella virale intatta ed è tipo-specifica, cioè specifica per ogni tipo di HPV [73, 74]. L'immunità umorale è generata in circa il 60% degli individui infettati [71] limitata nel tempo (<36 mesi), non protettiva e in ogni caso il titolo degli anticorpi neutralizzanti è basso [75]. Quindi teoricamente una re-infezione con lo stesso genotipo è possibile.

## **1.4. PATOLOGIE CORRELATE ALL'INFEZIONE DA HPV**

Le manifestazioni cliniche dell'infezione virale da HPV dipendono dalla sede della lesione e dal tipo di virus infettante. I tipi oncogeni di HPV, infatti, oltre ad essere responsabili della totalità dei cervicocarcinomi, sono responsabili di oltre il 40% dei tumori dei genitali esterni (vulva, vagina e pene) e il 90% dei tumori all'ano [76].

### **PATOLOGIE CUTANEE**

Gli HPV associati ad infezioni cutanee non genitali causano lesioni verrucose benigne, come verruche comuni, plantari e planari. In percentuale minore essi sono correlati a patologie maligne, tra cui l'epidermodisplasia verruciforme (EV) [77].

### **PATOLOGIE DELLE MUCOSE**

Gli HPV associati ad infezioni mucosali sono in grado di infettare le mucose del tratto ano-genitale, quelle del tratto respiratorio, della cavità orale e della congiuntiva. Le infezioni con HPV ad alto rischio oncogeno sono in grado di progredire verso forme cliniche maligne, tra cui il carcinoma del tratto respiratorio e della cavità orale, il carcinoma verrucoso di *Brusche-Löwenstein*, la neoplasia intraepiteliale vulvare (VIN) e vaginale (VAIN), il carcinoma vaginale (VC) e cervicale ed il cancro anale e penile.

Fra le più comuni manifestazioni cliniche correlate alle infezioni delle mucose genitali troviamo manifestazioni benigne, come i condilomi, e manifestazioni maligne, come il carcinoma della cervice uterina.

#### **I CONDILOMI**

I condilomi rappresentano le manifestazioni cliniche benigne a maggior prevalenza e colpiscono circa l'1-2% della popolazione sessualmente attiva [78]. Essi possono interessare sia le regioni ano-genitali, sia l'apparato respiratorio. Le infezioni genitali sono generalmente associate ad HPV-6 ed 11, coinvolti rispettivamente per il 60% e il 30%; un'inversione di percentuale si riscontra, invece, in forme di papillomatosi della laringe [79].

A livello macroscopico, i condilomi acuminati si presentano sottoforma di papule, noduli singoli o multipli, in grado di progredire fino ad

assumere la caratteristica di grosse placche dall'aspetto simile a quello di un cavolfiore.

Una rara forma di condiloma acuminato ano-genitale è rappresentato dal condiloma gigante, o sindrome di *Buschke-Löwenstein*, considerato un carcinoma verrucoso. Questa patologia si presenta come ammassi di condilomi acuminati giganti che raramente danno origine a metastasi. In tutti i tumori indagati è stato rilevato acido nucleico sia di HPV-6 sia di HPV-11 [80].

Un particolare tipo di condilomatosi è quello associato a condilomi piatti (neoplasia squamosa intraepiteliale). Essi rappresentano le lesioni più comuni rilevabili a livello cervicale, anche se facilmente riscontrabili sulla mucosa vulvare, anale e dei genitali maschili. Appaiono come formazioni simili a placche dal colore bianco.

A livello microscopico è possibile riconoscere alterazioni coilocitiche (dal greco *koilos*: vuoto) delle cellule, caratterizzate da vacuolizzazione citoplasmatica perinucleare, atipie e pleiomorfismo nucleare [81, 82].

L'architettura generale del tessuto condilomatoso si presenta generalmente con integrità della membrana basale (fino allo sviluppo del carcinoma *in situ*), frequenti mitosi, infiltrazioni stromali di leucociti non nucleati, acantosi e ipercheratosi degli strati superficiali.

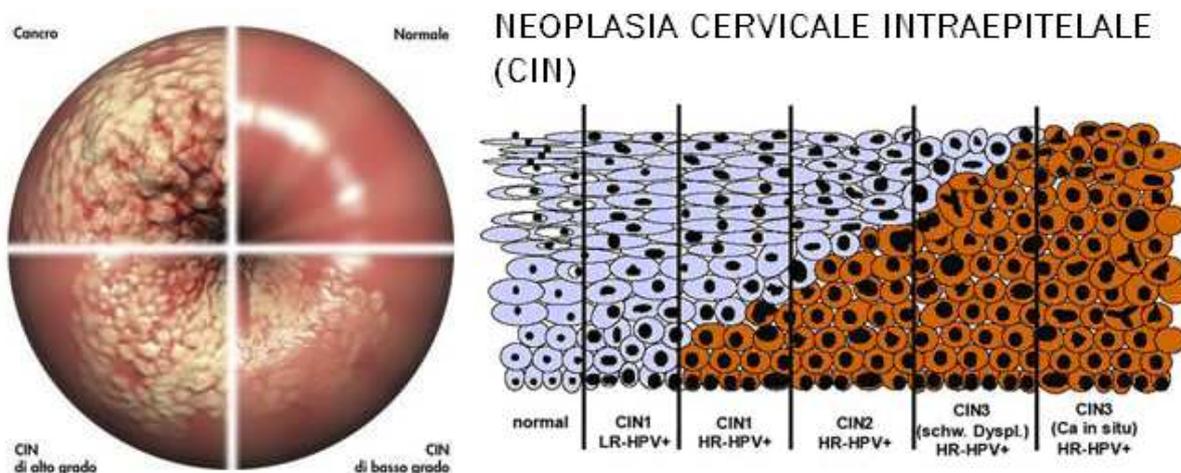
#### **IL CARCINOMA DELLA CERVICIA UTERINA**

Il carcinoma cervicale è il primo cancro a essere riconosciuto dall'OMS come totalmente riconducibile a un'infezione [83]. Il carcinoma della cervice è infatti causato dall'infezione genitale da HPV e si posiziona al secondo posto tra i tumori femminili, dopo il tumore del seno. Ciò che differenzia principalmente la gravità della patologia è il coinvolgimento di HPV ad alto rischio, la persistenza e la possibile integrazione di HPV-DNA nel genoma della cellula ospite.

Le neoplasie intraepiteliali cervicali (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*, CIN), secondo il sistema di classificazione istopatologica dell'OMS sono caratterizzate da alterazioni che vanno dalla displasia lieve (CIN 1) alla displasia moderata (CIN 2) alla displasia severa e al carcinoma *in situ* (CIS) (entrambe definite CIN 3) [83]. La nomenclatura citologica delle lesioni cervicali è rimasta a lungo confusa, determinando problemi di confrontabilità dei risultati degli studi scientifici e delle procedure diagnostiche e cliniche. Pertanto, è stato

proposto un sistema revisionato di nomenclatura noto come "The Bethesda System" [84].

Le lesioni intraepiteliali squamose sono state classificate come "di basso grado" (*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion*, LSIL), che includono la CIN 1 e le lesioni condilomatose, e "di alto grado" (*High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*, HSIL), che includono lesioni precedentemente classificate come CIN2 e CIN3 (Figura 4).



**Figura 4:** Modificazioni epiteliali associate all'infezione da HPV ([www.drstandley.com](http://www.drstandley.com)).

In questo sistema, cellule squamose atipiche (*Atypical Squamous Cell*, ASC) vengono classificate "di significato indeterminato" ("of *Undetermined Significance*", ASCUS) o "che non possono escludere HSIL" ("cannot exclude HSIL", ASC-H). E' stato dimostrato che la maggior parte delle infezioni sono transienti e che la persistenza è un importante fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie della cervice. Regressioni spontanee delle lesioni displastiche (CIN 1 e CIN 2) sono state riportate nell'80% delle donne di età inferiore a 35 anni ed in circa il 40% delle donne in età avanzata [85]. La persistenza, spesso legata al tipo di HR-HPV infettante, è indice di alto rischio di progressione tumorale.

Nei casi di progressione delle lesioni intraepiteliali, è stato stimato che sono necessari 4-5 anni, fino ad un massimo di 7, per la transizione da displasia lieve a displasia severa, 9-10 anni per la transizione da CIN 3 a carcinoma sub-clinico ed altri 5 anni per la progressione a forme di carcinoma cervicale invasivo. La progressione non prevede necessariamente un passaggio obbligato in tutti e 3 gli stadi. Sono stati

infatti documentati casi di sviluppo di CIN 3 senza una precedente lesione di basso grado. Molte LSIL non progrediscono ad HSIL e soltanto l'1% progredisce a cancro invasivo.

Una meta-analisi di 64 studi che prende in considerazione oltre 15.000 casi di CIN e 274 di carcinoma, e finalizzata allo studio della storia naturale di CIN, ha evidenziato che il 57% dei soggetti presentanti CIN 1 andava incontro a regressione, il 32% manifestava lesioni persistenti, con una progressione verso il carcinoma *in situ* (CIS) dell'11% e verso il cancro cervicale invasivo (*Invasive Cervical Cancer*, ICC) dell'1%. Nei soggetti con CIN 2 le lesioni regredivano nel 43% dei casi, persistevano nel 35% e progredivano nel 27% dei casi (22% verso CIS e 5% verso ICC); infine, i soggetti con CIN 3 mostravano una ridotta capacità di regressione (32% dei casi) ed un'aumentata persistenza del virus (<56%) che sfociava in una progressione verso il carcinoma cervicale invasivo (>12%) [86].

Si è osservato che in tutti i tumori positivi per HPV-16, il genoma virale si presentava o in forma integrata oppure in entrambe le forme (episomale ed integrata). In particolare, nelle co-infezioni con HPV-18, il genoma di HPV-16 è stato ritrovato principalmente nello stato episomico. Diversamente, nelle infezioni singole da HPV-16, la forma più frequente è risultata essere quella integrata. Tale evidenza suggerisce una sorta di competizione per il sito di integrazione genomica. L'integrazione di HPV-16 è associata in modo significativo all'invasività. Le forme integrate di HPV-16 sono più frequenti nelle forme tumorali invasive, mentre in forme pre-invasive è più facile l'identificazione di HPV-16 nel suo stato episomico. L'integrazione completa di HPV-18 in tutti i tipi di tumore, anche in lesioni pre-neoplastiche, indica un comportamento diverso nelle trasformazioni a livello genitale e riflette una maggiore aggressività, intesa come maggiore velocità della progressione tumorale. È da sottolineare, comunque, che l'integrazione del genoma non sia obbligatoriamente coinvolto nella trasformazione in senso maligno.

## **1.5. VIE DI TRASMISSIONE**

HPV utilizza diverse vie per assicurarsi il contagio e la propagazione nell'ospite. L'infezione è fortemente condizionata dall'equilibrio che si instaura fra ospite, ambiente ed agente infettante [87]. Il virus dell'HPV si contrae principalmente a seguito di contatto diretto, sia di tipo cutaneo, per quanto riguarda le infezioni cutanee, sia di tipo sessuale, per quanto riguarda le infezioni a livello delle mucose genitali. Può seguire anche una trasmissione di tipo verticale da madre a figlio durante la gravidanza o durante il parto [88]. La trasmissione attraverso contatti genitali non penetrativi è rara ma possibile. L'uso del preservativo riduce del 60% [89] il rischio di trasmissione ma non è completamente protettivo [90]. La principale malattia causata da HPV ed espressa clinicamente alla nascita è la papillomatosi respiratoria (RP) imputabile ad HPV-6 e HPV-11 [91, 92].

Un tipo di trasmissione di non facile documentazione, ma responsabile di alcuni casi di esposizione non sessuale, è quella per fomiti, ossia per contagio indiretto attraverso oggetti contaminati quali asciugamani, biancheria intima, lettini per l'abbronzatura, maniglie di porte o, ancora, tramite strumentazioni ad uso medico.

## 1.6. EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE DA HPV

Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato una relazione causale tra l'infezione da HPV genitali ed alcuni tumori nella regione ano-genitale, in particolare quello della cervice uterina [93]. Il DNA di HPV è stato rilevato in percentuali del 100% nei carcinomi cervicali, del 40% nei tumori del pene/vulva/vagina rispettivamente, del 90% nei carcinomi anali, del 12% nei carcinomi orofaringei e del 3% dei carcinomi della bocca (Tabella 2) [89, 94].

Developed countries					Developing countries		
Site	Attributable to HPV (%)	Total cancers	Attributable to HPV	All cancer (%)	Total cancers	Attributable to HPV	All cancer (%)
Cervix	100	83,400	83,400	1.7	409,400	409,400	7
Penis	40	5,200	2,100	0.0	21,100	8,400	0.1
Vulva/vagina	40	18,300	7,300	0.1	21,700	8,700	0.1
Anus	90	14,500	13,100	0.3	15,900	14,300	0.2
Mouth	3	91,200	2,700	0.1	183,100	5,500	0.1
Oropharynx	12	24,400	2,900	0.1	27,700	3,300	0.1
All sites		5,016,100	1,115,500	2.2	5,827,500	449,600	7.7

**Tabella 2:** Tumori associati ad infezioni da HPV nei Paesi industrializzati e nei Paesi in via di sviluppo nel 2002 (M. Stanley, *Gynecologic Oncology* 117 (2010); S5-S10).

Tra tutti i tumori, il carcinoma invasivo della cervice uterina è il più comune a livello mondiale e, nelle donne è collocato al secondo posto dopo quello del seno [95, 96] con oltre 530.000 nuovi casi l'anno e 275.000 morti [97]. Circa l'80% dei casi di carcinoma invasivo della cervice uterina si verifica nei Paesi in via di sviluppo, dove il rischio di infezione è molto alto e risulta problematica l'introduzione di programmi di screening. Nell'Unione Europea si stimano annualmente 34.000 nuovi casi e 16.000 decessi [98]. Il tasso di mortalità è molto disomogeneo: il più alto in Romania (13,7/100.000) e il più basso in Finlandia (1,1/100.000). In Italia, i dati dei registri nazionali tumori relativi al 1998-2002 mostrano che ogni anno si hanno circa 3400 nuovi casi incidenti della cervice con circa 1200 decessi [99]; il tasso d'incidenza è di circa 8/100.000 donne e si trova in linea con gli altri Paesi del Nord-Europa [100].

A livello mondiale, il dato di prevalenza dell'infezione risulta compreso tra il 19,7% ed il 39% nelle giovani donne con età tra 18-26 anni [100, 101].

Studi italiani di recente pubblicazione, confermano questo dato. In uno studio condotto su 3000 donne di diverse regioni italiane nella fascia

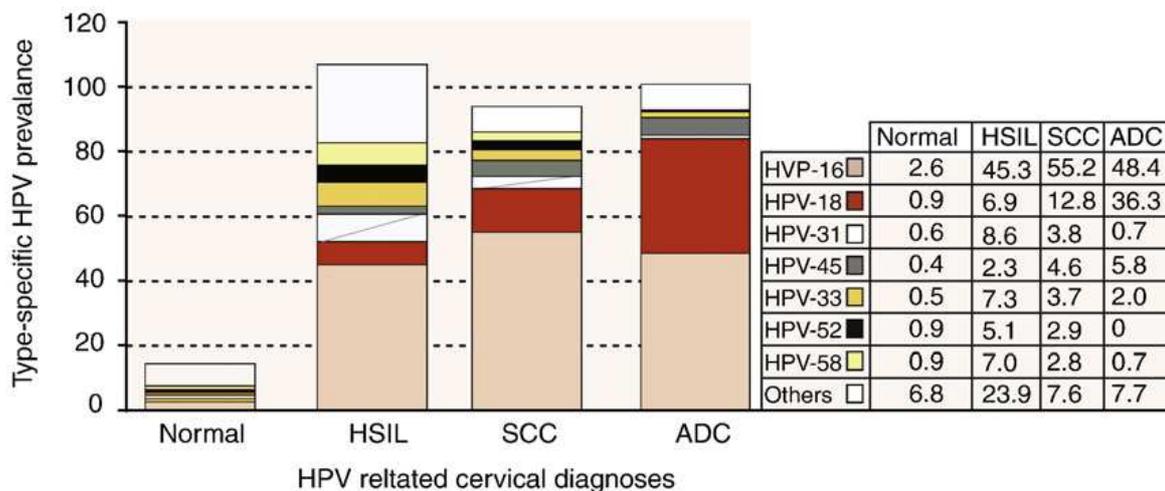
d'età tra 18-24 anni viene stimata una prevalenza del 23,7% [102]. Per quanto riguarda invece la fascia di adolescenti con età inferiore ai 18 anni i dati in letteratura sono scarsi, probabilmente anche a causa delle maggiori difficoltà nel reclutamento del campione da studiare. Per questo motivo non esistono al momento stime accurate circa la prevalenza di HPV in questa popolazione. Tuttavia, sono stati condotti alcuni studi di prevalenza su gruppi di adolescenti afferenti a centri di screening per le IST. Tali studi riportano valori di prevalenza dell'infezione da HPV tra il 28,2% ed il 34,2% [103, 104].

Riguardo i genotipi di HPV circolanti in Italia, nella quasi totalità degli studi effettuati in donne HPV-DNA positive, HPV-16 risulta essere il prevalente, tra i tipi HR, con frequenze tuttavia molto variabili, dal 9 al 61% in rapporto alla popolazione analizzata ed al grado di displasia diagnosticato [105-107].

Una meta-analisi pubblicata nel 2007 [108] che ha incluso 130 studi sul cancro invasivo della cervice uterina, ha rilevato la presenza dell'infezione di HPV nell'87% dei casi di cervicocarcinoma, variando dall'86% in Europa, Asia e Nord America al 94% in Africa.

Da questa meta-analisi HPV-16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58 risultano essere i genotipi più comuni riscontrati nei tumori [89, 109, 110]. Infatti, si è riscontrato che HPV-16 e HPV-18 sono responsabili del 70% dei tumori della cervice (dal 65% nell'America Centrale e Meridionale al 76% nell'America del Nord): in particolare HPV-16 è riscontrato nel 55% di CC (dal 52% in Asia la 58% in Europa) e HPV-18 nel 12,8% (dal 13% in America del Sud e Centrale al 22% in America del Nord). In Asia invece HPV-58, 52 e 33 sono i tipi maggiormente presenti nei tumori rispetto agli altri continenti (Figura 5).

Per quanto riguarda gli adenocarcinomi della cervice il 48% è attribuibile a HPV-16 e il 36% ad HPV-18 [89]. Nelle lesioni citologiche, HPV è riscontrato nell'85% delle HSIL e nel 71% delle LSIL [111] (Figura 5).



Type-specific HPV prevalence across the spectrum of HPV related cervical diagnoses. Multiple infections counted several times.

ADC = adenocarcinoma; HPV = human papillomavirus; HSIL = high squamous intraepithelial lesions; SCC = squamous cervical carcinoma.

**Figura 5:** prevalenza tipo-specifica di HPV nella citologia normale, nelle lesioni di alto grado e nei carcinomi cervicali invasivi (M. Stanley, *Gynecologic Oncology* 117 (2010); S5-S10).

La stima mondiale di prevalenza dell'infezione da HPV è pari a circa il 10,2% in donne con citologia normale, con ampie differenze regionali e maggiore prevalenza in Africa (22,1%) [112, 113]. Il picco di prevalenza maggiore dell'infezione si raggiunge nelle donne di 25 anni (in media 16,9%): oltre tale età la prevalenza inizia a diminuire. In alcuni studi si è osservato un secondo picco nella fascia di età 45-54 (Figura 6).

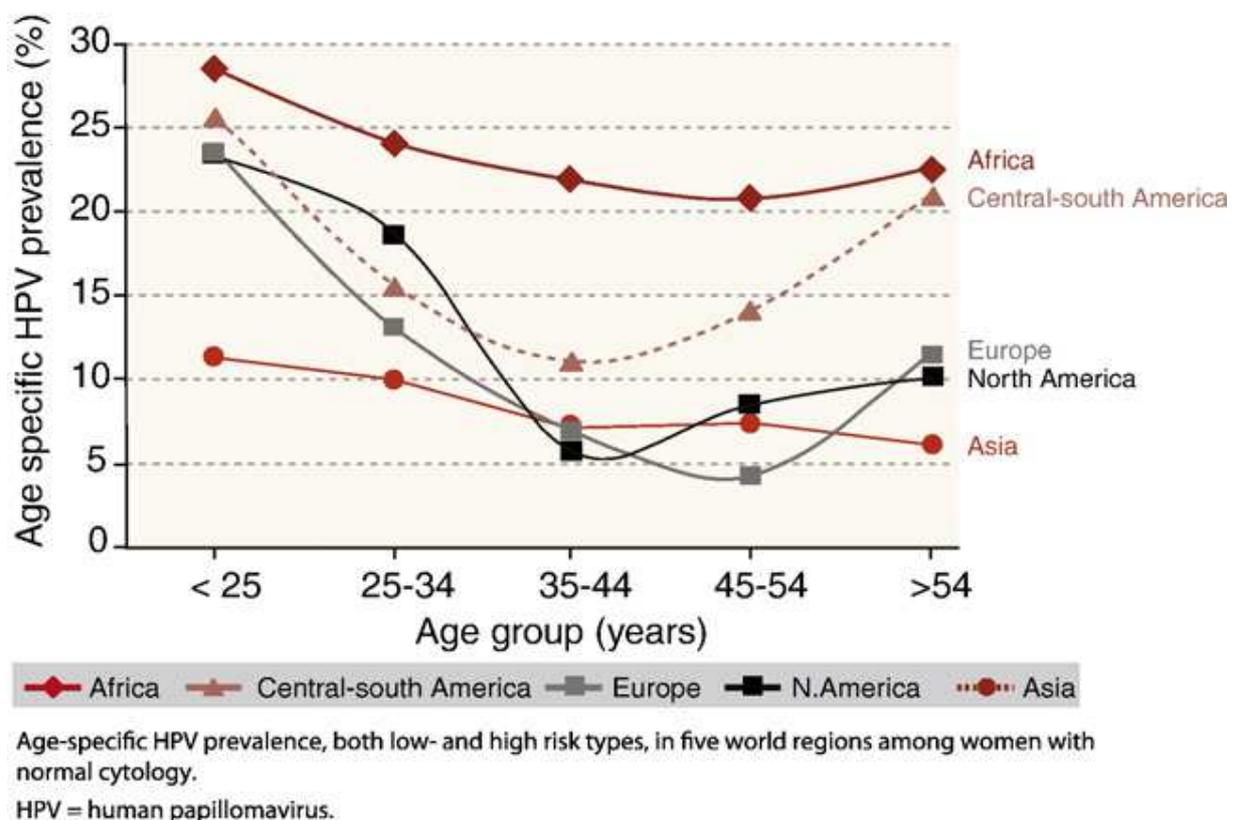
Non è chiaro a cosa sia dovuto il secondo picco di prevalenza dell'infezione da HPV in donne con citologia normale nel periodo perimenopausale; l'acquisizione di nuove infezioni da HPV dovute a modifiche dello stile di vita in queste fasce d'età e la riattivazione di infezioni latenti a seguito dell'invecchiamento del sistema immunitario sono tra le possibili motivazioni.

Un articolo pubblicato nel 2009 riporta dati di prevalenza dell'infezione da HPV nella popolazione generale femminile dell'Unione Europea (UE), ottenuti selezionando 18 studi condotti in 14 Paesi [114]. Da tale lavoro emerge un'importante variabilità tra gli Stati europei, con un tasso grezzo di prevalenza dell'infezione da HPV che va dal 3% in Spagna e Grecia al 15% in Danimarca, Regno Unito, Irlanda, Francia e Belgio. Le infezioni da HPV-16 e/o 18 rappresentano il 29,8% e il 12% delle donne positive per HPV ad alto rischio. Standardizzando per età, i tassi di

prevalenza di infezioni da HPV ad alto rischio oncogeno variano da 1,7% in Spagna al 12,5% in Belgio in donne di 30-64 anni.

Per quanto riguarda la prevalenza dell'infezione da HPV in Italia, i dati disponibili su donne di età compresa tra 17-81 anni, afferenti a programmi di screening organizzato o ad ambulatori per controlli ginecologici di routine, si attestano fra il 6,5% e il 16%. In donne con citologia normale, in presenza di displasia severa o carcinoma, il dato si attesta al 35-63% e 80-96% rispettivamente [115].

Il picco di prevalenza si evidenzia nella fascia di età compresa tra i 14 e i 25 anni; l'infezione si contrae infatti poco dopo l'esordio sessuale, data la via di trasmissione e l'ampia diffusione del virus [85, 106]. Il tasso decresce poi con l'aumentare dell'età, in quanto la risposta immunitaria specifica è in grado di prevenire le possibili infezioni future [107, 108, 109].



**Figura 6:** prevalenza a livello mondiale dell'infezione genitale di HPV in donne con citologia normale nelle diverse fasce d'età.

Riguardo i genotipi di HPV circolanti in Italia, nella quasi totalità degli studi effettuati in donne HPV-DNA positive, HPV-16 risulta essere il prevalente, tra i tipi HR, con frequenze tuttavia molto variabili, dal

9 al 61% in rapporto alla popolazione analizzata ed al grado di displasia diagnosticato [55, 115, 120].

## 1.7. METODI DIAGNOSTICI PER L'IDENTIFICAZIONE DELL'INFEZIONE

### DA HPV

La diagnosi di infezione genitale da HPV include l'evidenza clinica, quella citologica, microscopica e la ricerca del genoma virale.

La diagnosi su base clinica è un approccio estremamente aspecifico per riconoscere un'eventuale infezione da HPV in quanto nella maggior parte dei casi (eccetto che per verruche e condilomi) le infezioni sono invisibili ad occhio nudo.

Le lesioni displasiche, che possono precedere la forma in situ del tumore, la quale a sua volta può precedere la forma invasiva, necessitano per la loro identificazione di un'indagine citologica e colposcopica [27, 60].

#### **INDAGINE CITOLOGICA**

Anomalie citologiche associate all'infezione da HPV a livello delle regioni anali e genitali sono rilevabili tramite esecuzione del test citologico condotto su cellule esfoliate dell'epitelio squamoso di suddette regioni [20]. Tali cellule vengono prelevate con una spatola, strisciate su un vetrino e, dopo opportuna colorazione, osservate al microscopio ottico [27].

In tal modo è possibile identificare quei cambiamenti morfologici che le cellule infette con HPV mostrano: un alone perinucleare ed un aumento della densità del citoplasma, cambiamenti nella forma e nella dimensione sia del citoplasma che del nucleo, con ipercromasia di quest'ultimo. Tali modificazioni cellulari sono note come "atipia coilocitica" (Figura 7) [121, 122].



**Figura 7.** Immagine al microscopio ottico di cellule infette con HPV che mostrano un citoplasma chiaro e nuclei dilatati ([www.sciencephotolibrary.com](http://www.sciencephotolibrary.com)).

Le anomalie cellulari diagnosticabili possono rientrare in quattro categorie secondo la classificazione *Bethesda 2001*: ASC (cellule squamose atipiche), di significato indeterminato (ASCUS) o che non possono escludere H-SIL (ASC-H); L-SIL, H-SIL e carcinoma (Tabella 3) [84]. In tal modo è possibile individuare una lesione precancerosa o già carcinomatosa.

<b>Esito del Pap-test</b>	<b>Interpretazione</b>
<b>Negativo</b>	Non sono presenti alterazioni citologiche
<b>ASC-US</b> ( <i>Atypical Squamous cells of Undetermined Significance</i> )	Cellule squamose con atipie di significato indeterminato
<b>ASC-H</b> ( <i>Atypical Squamous cells cannot exclude H-SIL</i> )	Atipie di significato indeterminato, possibile displasia di alto grado
<b>L-SIL</b> ( <i>Low-grade Squamous Intraepithelial lesions</i> )	Displasia di basso grado
<b>H-SIL</b> ( <i>High-grade squamous intraepithelial lesions</i> )	Displasia di alto grado
<b>Carcinoma</b>	Carcinoma a cellule squamose invasivo. Carcinoma ghiandolare invasivo (adenocarcinoma).

**Tabella 3.** Significato dell'esito del Pap-test secondo la classificazione Bethesda 2001. (Solomon et al. JAMA 2002; 2114-2119).

Questa metodica presenta, tuttavia, un alto tasso di falsi negativi che si aggira intorno al 20%: di questi i 2/3 sono attribuibili ad errori di campionatura (raschiamento inadeguato), mentre 1/3 ad una non corretta interpretazione [123, 124]. Oltre ad essere moderatamente accurata, non raggiunge elevati valori di sensibilità e specificità: da una meta-analisi su 62 studi è stata stimata una sensibilità del 58% (range 11-99%) ed una specificità del 68% (range 14-97%) [125].

Per risolvere alcuni di questi problemi si è cercato di aumentare l'efficacia di tale test, migliorando le tecniche di campionamento e di allestimento dei preparati; sono stati così introdotti, da circa 10 anni, metodi citologici in fase liquida (citologia su strato sottile), da usare in alternativa al Pap-test: il ThinPrep® è il più diffuso di questi metodi. Quest'ultimo prevede che il materiale esfoliato sia raccolto in un flacone contenente una soluzione conservante e, successivamente,

processato tramite un sistema automatizzato che permette: 1) la dispersione cellulare, per assicurare l'omogeneità del campione, 2) la separazione delle cellule da sangue, muco e detriti, 3) il trasferimento delle cellule su una membrana filtro e, 4) la deposizione delle cellule su un vetrino così da formare uno strato sottile. Con tale metodo si ottiene un campione rappresentativo, privo di elementi oscuranti, e quindi un vetrino chiaro, uniforme ed riproducibile [123].

Studi clinici confermano la superiorità del ThinPrep® rispetto al Pap-test convenzionale, esso, infatti, ha la potenzialità di ridurre significativamente la percentuale di risultati non soddisfacenti al Pap-test, di aumentare l'individuazione di L-SIL (del 50%) e di H-SIL (del 18%) ed infine di ridurre il numero di ASCUS (del 15%) in confronto alla citologia convenzionale [126-128].

#### INDAGINE MOLECOLARE

I metodi molecolari utilizzati oggi per la ricerca e tipizzazione del virus sono molteplici; essi sono in grado di rilevare la presenza del DNA virale a partire dai campioni biologici (prelievo citologico) e possono fornire informazioni sulla presenza di HPV ad alto e basso rischio oncogeno o di uno o più genotipi specifici [129, 130]. Sono test diretti che, nella popolazione femminile, risultano caratterizzati da elevata sensibilità e specificità; nella popolazione maschile le difficoltà associate alla raccolta del campione biologico da esaminare determinano un maggior numero di risultati "falsi negativi".

I saggi usati sono l'ibridazione molecolare e la reazione enzimatica di amplificazione genica (*Polymerase Chain Reaction*, PCR).

Tramite le tecniche di ibridazione è possibile ricercare il DNA virale con sonde molecolari complementari a specifici genotipi di HPV utilizzando il DNA estratto da tessuti fissati o cellule esfoliate [27].

Il test di **ibridazione Southern blot**, per la sua alta sensibilità (0,1-1 copie di genoma virale per 100.000 cellule) e specificità, per lungo tempo è stato considerato il metodo di riferimento per l'identificazione di HPV, ma è un metodo lungo, laborioso e richiede una grande quantità di materiale [129, 130].

L'**ibridazione in situ** è l'unico test nel quale il segnale di identificazione del genoma virale è visto in relazione topografica al preparato istologico o citologico; con la possibilità di visualizzare anche una sola cellula infetta, ha una sensibilità di 20-50 copie di

genoma virale per cellula e permette anche l'identificazione di diversi tipi virali [129, 130].

Il saggio molecolare *Hybrid Capture 2* (test HPV HC2, Qiagen, Germany) si basa su una **ibridazione in soluzione** tra DNA virale e sonde a RNA specifiche per 18 tipi di HPV (13 ad alto rischio: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68; e 5 a basso rischio: 6, 11, 42, 43, 44), e permette di differenziare gli HPV a basso rischio da quelli ad alto rischio mediante tecnologia di amplificazione del segnale in chemiluminescenza [129-133]. Questo saggio è sufficientemente sensibile da identificare 1 pg di HPV-DNA/ml (circa 10<sup>5</sup> copie di HPV-DNA/ml). È l'unica metodica in commercio approvata dalla *Food and Drug Administration* (FDA) americana per uso clinico [133]; in diversi paesi è utilizzata per distinguere le infezioni da HPV ad alto o basso rischio nel follow up di donne con esito citologico di ASCUS [132, 133].

La ricerca di HPV-DNA può essere effettuata anche tramite **PCR**, che permette di evidenziare il genoma virale amplificandone sequenze altamente conservate (L1). Il saggio di PCR permette di associare elevata sensibilità ed elevata specificità nella diagnosi di infezione da HPV, potendo rilevare dalle 10 alle 100 copie di DNA virale, rispetto alle 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> dei metodi convenzionali; inoltre richiede una piccola quantità di campione ed è in grado di amplificare un ampio numero di tipi di HPV in una singola reazione di amplificazione [134, 135].

L'identificazione tipo-specifica può essere eseguita con vari metodi: l'**ibridazione inversa** (**LIPA**) con sonde tipo-specifiche, la **digestione** dell'amplificato con specifici enzimi di restrizione (**RFLP**), ed il **sequenziamento** nucleotidico dell'amplificato [20, 27].

In alternativa potrebbero essere impiegati sistemi di **amplificazione genica tipo specifici** utilizzando coppie di primer specifici per i singoli tipi virali [131].

I recenti avanzamenti nel campo della nanotecnologia propongono l'uso di **microchip** nelle procedure di identificazione e tipizzazione virale. Tali procedure garantiscono un'elevata sensibilità soprattutto nella determinazione di infezioni multiple [136, 137].

La **determinazione quantitativa del DNA** virale tramite PCR *Real-time*, che al momento viene effettuato solo nei laboratori di ricerca [138] potrebbe avere una utilità clinica. La carica virale si è rilevata essere, infatti, un importante fattore di rischio per la persistenza

dell'infezione ed il conseguente rischio di sviluppare una displasia [139, 140]. Studi confermano la validità di questo approccio sia nell'identificazione di lesione cervicale in corso, che nella selezione di pazienti che svilupperanno la lesione durante il follow-up [50, 141]. Vi sono altre metodiche, più adatte alla ricerca che all'applicazione clinica, le quali determinano se il DNA virale è integrato nei cromosomi della cellula ospite o se è in stato episomiale utilizzando come marcatore indiretto le misurazioni degli RNA messaggeri di E6 ed E7 [142].

Studi longitudinali hanno dimostrato la maggior sensibilità dei test molecolari rispetto alla citologia convenzionale nell'identificare lesioni cervicali di alto grado [141, 142]. Tuttavia l'elevata frequenza di infezioni, soprattutto nelle donne giovani, destinate alla risoluzione spontanea, e quindi prive di qualsiasi valenza clinica, riduce molto sia la specificità sia il valore predittivo positivo del test molecolare.

La significatività del test potrebbe allora essere incrementata da altri marcatori quali l'identificazione del/dei tipi virali coinvolti nell'infezione, la valutazione quantitativa del DNA virale, la quota di integrazione e l'espressione degli RNA messaggeri degli oncogeni virali [143].

L'utilizzo in ambito clinico dei test molecolari per l'identificazione dei tipi di HPV ad alto rischio, ad oggi, è limitato al follow-up di donne con risultato citologico di ASCUS. Questo permette di chiarire l'interpretazione dei risultati equivoci ed inviare a colposcopia solo quelle pazienti con un'infezione virale ad alto rischio oncogeno [144, 145].

## **1.8. STRATEGIE DI PREVENZIONE PER L'INFEZIONE DA HPV E PER L'INSORGENZA DEL TUMORE**

La prevenzione è importante per ridurre il tasso d'incidenza delle infezioni genitali e, di conseguenza, anche quello delle lesioni e dei tumori ad esse associati [126].

### **PREVENZIONE PRIMARIA**

Esistono strategie che risultano essere probabilmente efficaci nel prevenire il cancro cervicale e le infezioni genitali causate da HPV. Queste possono essere effettuate dal singolo individuo e da interventi di Sanità Pubblica [118].

Accertato l'importante ruolo del contatto sessuale come fattore di rischio nell'infezione genitale da HPV, le strategie di prevenzione primaria prevedono una serie di comportamenti individuali atti a diminuire il rischio di trasmissione del virus da una persona infetta ad una non infetta. Si consiglia, quindi, di evitare il contatto con infezioni genitali, di limitare il numero di partners sessuali, di prediligere una relazione monogama e di far uso del preservativo.

In realtà, da quanto emerso da studi epidemiologici, l'uso del preservativo conferisce solo una protezione parziale [127]; infatti l'infezione si può trasmettere anche per contatto diretto con parti intime infette non protette da tale dispositivo [62] (è stata dimostrata solo una riduzione del 60% del rischio di infezione se il preservativo viene usato in modo corretto e abitualmente) [128].

La Sanità Pubblica dovrebbe promuovere l'incremento di test di screening tra le donne, promuovere la vaccinazione anti-HPV e continuare le ricerche epidemiologiche e di laboratorio sulle infezioni genitali da HPV.

### **STRATEGIA VACCINALE**

Il carcinoma cervicale è una rara conseguenza di un'infezione dovuta ad alcuni tipi di HPV mucosotropici. In termini di Sanità Pubblica, l'importanza di questa scoperta è paragonabile all'associazione tra fumo di sigaretta e carcinoma polmonare o tra la persistenza di un'infezione da epatite B o C con il rischio di carcinoma del fegato. Infatti, come

per l'epatite B, intense ricerche si sono sviluppate per produrre e commercializzare vaccini profilattici diretti contro specifici tipi di HPV in grado di prevenire lesioni pretumorali legate a infezioni di questi tipi e, di conseguenza, ridurre l'insorgenza di cancro invasivo. Sono stati così allestiti dei vaccini preventivi capaci di stimolare la produzione di anticorpi neutralizzanti specifici. Tali vaccini sono costituiti dalle *Virus Like Particles* (VLPs): particelle simil-virioniche prive di capacità infettante costituite dalla proteina capsidica maggiore L1, prodotta in cellule di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) mediante tecnologia del DNA ricombinante, in grado di auto assemblarsi [146]. È stato dimostrato che le VLPs inducono una forte risposta immunitaria; inoltre la protezione da esse conferita è tipo specifica, quindi le formulazioni vaccinali devono essere polivalenti [146-148].

I tipi ad alto rischio oncogeno 16 e 18 sono responsabili di oltre il 70% dei carcinomi cervicali. L'immissione in commercio di due vaccini contro i genotipi 16 e 18 ha aperto nuove frontiere alla prevenzione.

In Italia sono in commercio i vaccini Cervarix® (GlaxoSmithKline) e Gardasil® (Sanofi Pasteur MSD): quest'ultimo protegge anche dai genotipi a basso rischio oncogeno 6 e 11, che causano condilomi [149, 150]. L'Italia è stato il primo Paese europeo a pianificare una strategia di vaccinazione pubblica contro il virus HPV: l'Agenzia per il Farmaco (AIFA) e il Consiglio Superiore di Sanità hanno ritenuto opportuno vaccinare gratuitamente tutte le ragazze al compimento dell'undicesimo anno di età, trovando il consenso delle Regioni.

L'approvazione dei vaccini HPV da parte delle maggiori autorità regolatrici mondiali e la successiva commercializzazione sono state più rapide rispetto anche alle migliori previsioni. Tale rapidità è dovuta all'elevata efficacia (vicina al 100%) subito emersa nella prevenzione delle infezioni e delle lesioni precancerose (CIN) di alto grado derivanti dai tipi di HPV presenti nel vaccino stesso [151, 152]. Questo ha però determinato la necessità di prendere subito decisioni anche in mancanza di alcune informazioni chiave per l'identificazione della migliore strategia da attuare, come ad esempio la durata della protezione e l'efficacia nelle donne già infettate da HPV.

Ovviamente, la durata della protezione è nota solo per il tempo di osservazione disponibile negli studi clinici. Questa incertezza ha portato a scegliere un'età anteriore all'inizio dei rapporti sessuali, ma non troppo precedente ad essi (cioè 11-12 anni) come la migliore per

organizzare campagne di immunizzazione di massa. Il meccanismo di azione del vaccino è legato alla neutralizzazione del virus quando è ancora libero in vagina, prima della sua penetrazione nelle cellule dell'apparato genitale. Come ci si attendeva, non è pertanto stato riscontrato alcun effetto favorevole nelle donne che sono state vaccinate, per infrazione involontaria ai criteri d'inclusione negli studi clinici controllati, quando erano già infettate dai tipi di HPV contenuti nel vaccino. La protezione del 100% riportata contro CIN 2 e 3 deriva dalla cosiddetta analisi "by protocol". Nell'analisi "intention to treat" l'efficacia del vaccino scende al 39% (IC al 95%: 23,3-51,7%) perché molte delle donne randomizzate erano già state infettate da HPV-6, -11, -16 o -18. Quando vi è già un'infezione causata dai tipi di HPV presenti nel vaccino, questo non impedisce lo sviluppo di lesioni precancerose, ma non è ancora chiaro che cosa succede nelle donne (la grande maggioranza) in cui queste infezioni si risolvono spontaneamente (saranno protette dal vaccino contro eventuali reinfezioni?). Come per la durata della protezione, per conoscere l'effetto del vaccino sulle reinfezioni sarà necessario disporre di dati di follow-up più lunghi.

Le indicazioni d'uso del vaccino sono basate sulla dimostrazione di efficacia in donne di età compresa tra 16 e 26 anni e sulle evidenze attualmente disponibili; in accordo con le raccomandazioni dell'OMS, i 12 anni risultano essere, nella realtà italiana, l'età più indicata per la vaccinazione.

Tuttavia, l'introduzione di un vaccino anti-HPV che induce immunità verso alcuni genotipi e non altri potrebbe modificare nel tempo la circolazione dei genotipi virali nella popolazione, con il rischio di rendere maggiormente prevalenti genotipi attualmente minoritari. Tale ipotesi è supportata da modelli matematici [153]. Lo stesso meccanismo può essere ipotizzato anche per il rischio di emergenza di varianti "non-prototypes" di tipi virali verso cui è diretto il vaccino. Sono, infatti, descritte varianti dell'HPV-16 che presentano epitopi L1 antigenicamente differenti [154]; potrebbe, così, verificarsi il problema di *shift* antigenici determinati dalla pressione vaccinale con la conseguente riduzione dell'efficacia vaccinale nei loro confronti.

La disponibilità del vaccino HPV rappresenta, oltre che un'importante occasione di prevenzione individuale, soprattutto una rilevante opportunità per l'intera comunità. In tale contesto, è importante

pianificare le azioni di verifica necessarie al fine di valutare l'impatto e l'efficacia degli interventi realizzabili in questo ambito.

### **SCREENING PER IL TUMORE AL COLLO DELL'UTERO**

La progressione da lesioni cervicali precancerose a tumore invasivo è un processo lento (circa 10-15 anni) [155], ed è pertanto possibile arrivare ad una diagnosi precoce utilizzando come test di screening il Pap test, in grado di identificare le anomalie cervicali premaligne così da poterle trattare e, quindi, prevenire la maggior parte dei casi di tumore [156].

Il Pap test è una metodica utilizzata da oltre 60 anni per individuare il cervico-carcinoma e le lesioni pretumorali che possono portare a questa neoplasia. Il processo si è mantenuto praticamente inalterato fino ai nostri giorni dalla pubblicazione nel 1941 di G. Papanicolaou [157], dove si dimostrava la possibilità di diagnosticare precocemente lesioni pretumorali della cervice uterina attraverso un prelievo di cellule cervicali, la successiva strisciatura del materiale su un vetrino, la colorazione e l'analisi morfologica. La sensibilità del test non è molto elevata, come evidenziato da numerosi dati presenti in letteratura [125], che mostrano inoltre un'estrema disomogeneità con valori di sensibilità talvolta inferiori al 50%. È comunque un test molto efficace quando è inserito in un programma di screening organizzato che garantisce un alto livello qualitativo di tutto il processo e in particolare del test di screening. La lunga storia naturale dei precursori del cancro invasivo rende, cioè, un test di moderata sensibilità come il Pap test altamente protettivo all'interno di un percorso di screening ripetuto e controllato nelle diverse fasi. In questo contesto, la protezione di un Pap test eseguito ad intervalli regolari arriva al 90%.

In Italia, le raccomandazioni del Ministero della Salute [158] sugli screening auspicano l'implementazione di programmi organizzati con invito attivo e sistemi di valutazione e assicurazione di qualità. Esse confermano l'utilizzo della citologia (Pap test) come test di screening, da effettuare ogni tre anni per le donne di età compresa tra i 25 e i 64 anni. L'estensione dei programmi organizzati di screening è notevolmente aumentata negli ultimi anni, passando dal 41% del 2003 al 60% nel 2008 (nel 1998 era il 16%) [159]. L'adesione all'invito resta tuttavia

limitata (39,7%) ed è disomogenea tra le differenti aree geografiche (47,7% al nord, 40,2% al centro e 27,7% al sud) [159].

Negli ultimi 40 anni, la strategia di screening mediante Pap test ed il trattamento delle anomalie cervicali precancerose hanno portato ad un evidente decremento dell'incidenza (50-70%) e della mortalità (decremento del 5,3%, passando da un tasso di mortalità per 100.000 di 3,49 nel 1991 a 2,48 nel 2003) per tumore della cervice [160].

Secondo le linee guida dell'*American College of Obstetricians and Gynecologist* (ACOG) e dell'*American Cancer Society* (ACS), tutte le donne, una volta iniziata l'attività sessuale, dovrebbero sottoporsi al Pap-test per lo screening del tumore della cervice entro 3 anni dall'esordio sessuale e ripeterlo ogni 3 anni [161]. In alcune regioni d'Italia è attivo un programma di screening che prevede l'esecuzione gratuita del Pap test nella fascia d'età 25-64 anni.

Tuttavia, la sensibilità e la riproducibilità del Pap test sono state oggetto di critiche negli ultimi 10 anni: dati di letteratura hanno evidenziato valori di sensibilità estremamente variabili, compresi tra il 19% e il 76%. La riproducibilità ha risentito in particolare dell'adozione di criteri morfologici non univoci per le classi borderline. La scarsa concordanza interosservatore per queste classi è stata evidenziata in alcuni studi basati sulla circolazione di set di vetrini o di immagini digitali.

Per questo motivo si è cercato di ottimizzare il test di prevenzione convenzionale individuando nuovi approcci più sensibili, quali i metodi citologici in fase liquida che, pur avendo la potenzialità di ridurre significativamente la percentuale di risultati al Pap-test non soddisfacenti [126], non hanno portato tuttavia ad un miglioramento dei risultati di screening [127, 162].

I saggi molecolari per l'identificazione di HPV-DNA e di genotipi ad elevato potenziale oncogeno sembrerebbero essere, invece, un efficace strumento di prevenzione [123, 163, 164].

Studi prospettici hanno, infatti, dimostrato un elevato valore predittivo associato alla rilevazione di HPV-DNA per lo sviluppo di lesioni di alto grado in donne con Pap-test negativo; in particolare, il 15-28% delle donne positive al DNA virale con referto citologico normale sviluppa, entro due anni, una lesione intraepiteliale, mentre nelle donne risultate negative questo avviene solo nell'1-3% dei casi [165]. Lo IARC, con uno studio caso-controllo che ha coinvolto 9 nazioni, ha stabilito un odds

ratio di 173 per il tumore della cervice uterina ove vi sia positività per HPV DNA [166]. Inoltre, è stato confermato l'elevato valore predittivo negativo del test molecolare (95-99%) [27]: l'assenza di infezione con ceppi ad alto rischio consente di escludere lo sviluppo di una lesione di alto grado nei successivi 10 anni, con conseguente possibilità di aumento dell'intervallo temporale tra un test e l'altro e, quindi, una riduzione dei costi [123].

Ad oggi, sono in corso studi clinici caso-controllo per stabilire se la ricerca di HPV DNA possa essere affiancato o sostituito alla citologia in una nuova strategia di screening cervicale [167]. Diversi studi hanno mostrato che il test molecolare per l'HPV, insieme alla citologia convenzionale, ha una più alta sensibilità nel rilevare neoplasie cervicali intraepiteliali rispetto alla sola citologia, ma ha una specificità più bassa [126]. Nel 2004 l'OMS e lo IARC affermarono che ci sono sufficienti evidenze che il test molecolare riduce l'incidenza di carcinoma e il relativo tasso di mortalità, tanto che può essere effettuato in aggiunta alla citologia cervicale nello screening delle donne a partire dai 30 anni.

In uno studio effettuato in Canada la significatività relativa per le SIL del test molecolare è risultata sensibilmente più alta di quella della citologia (95% e 73% rispettivamente), così come quella per le H-SIL (95% e 90%), ma ha avuto una specificità relativa più bassa. È stato concluso che il test molecolare, in combinazione con la citologia, permette una miglior identificazione di lesioni precancerose rispetto alla citologia da sola: il test molecolare potrebbe così portare ad un più efficace e sicuro programma di screening [168].

Oltre all'alta sensibilità nel predire le lesioni cervicali di alto grado, il test in oggetto comporta anche un alto tasso di positività, per cui molte delle infezioni diagnosticate, specialmente nelle donne giovani, potrebbero essere di natura transiente [20]. Per tali ragioni l'utilità clinica del suddetto test, come indicato nelle linee guida per lo screening del tumore della cervice, è limitata alla risoluzione di Pap-test positivi per lesioni dubbie (ASCUS) o di basso grado (L-SIL) (ne consegue la riduzione dei risultati di screening di anormalità citologiche di basso grado di natura transiente ed invio a colposcopia solo per le donne con infezione persistente) e per il follow up di pazienti trattate per lesioni di alto grado (verranno così identificate le H-SIL da non trattare perché non progrediranno) [123, 163, 169].

## **L'INTEGRAZIONE DELLA STRATEGIA VACCINALE E DELLO SCREENING**

Fondamentale sarà capire come la vaccinazione possa integrarsi con i programmi di screening per la prevenzione del cervico-carcinoma. A fronte della relativa limitatezza dei dati reali, si è creata un'enorme richiesta di modelli statistici che prevedono l'impatto del vaccino, da solo o in combinazione con programmi di screening, sull'infezione da HPV e sul carcinoma della cervice. Verosimilmente, saranno necessari molti anni per poter valutare pienamente l'impatto dei vaccini, ma sottoporre a screening con l'attuale modalità una popolazione vaccinata rischia di essere poco efficiente.

La vaccinazione prima dell'inizio dell'attività sessuale è particolarmente vantaggiosa perché induce una protezione elevata prima di un eventuale contagio con l'HPV. Dunque, prima che le coorti vaccinate arrivino nelle classi di età in cui l'incidenza del cervico-carcinoma è più alta passeranno molti anni.

Analogamente a quanto accade per qualunque programma di vaccinazione o di prevenzione in generale, per decidere una strategia è necessario disporre di dati epidemiologici nazionali, dati di frequenza, di gravità e costi della malattia prevenibile che consentono di stimare il possibile impatto della vaccinazione nei diversi gruppi di popolazione e di valutarne il profilo costo-beneficio. Da qui, l'importanza di attuare studi per caratterizzare più accuratamente la storia naturale dell'infezione da HPV nella nostra popolazione, al fine anche di valutare l'impatto di un programma di vaccinazione sull'incidenza e sulla prevalenza delle infezioni e, in secondo luogo, sul numero di Pap test anormali o di displasie che necessitano oggi di indagini di approfondimento o di trattamento e che generano importanti costi per il servizio sanitario, nonché notevoli disagi psicologici alle donne. Inoltre, l'impatto della vaccinazione sull'epidemiologia e sulla carica di infezioni e di malattia per i tipi di HPV non coperti dal vaccino non è definito. Alcuni dati da trial [170] sui vaccini suggeriscono una cross-protezione contro gli HPV strettamente correlati ai tipi di HPV presenti nel vaccino. La possibilità del rimpiazzo dei tipi non contenuti nel vaccino con altri tipi oncogeni emergenti come causa di malattia è un argomento che deve essere valutato. La distribuzione delle infezioni da HPV in Italia non è infatti completamente nota, soprattutto per quanto riguarda la prevalenza età-specifica per genotipi virali e per area geografica, in particolare nelle adolescenti e giovani adulte (15-24 anni), sebbene esistano dati

locali sulle donne in età di screening. In Toscana [171] è stato attivato uno studio su un campione di circa 1000 donne di età compresa fra 18 e 25 anni al fine di valutare la prevalenza dell'infezione da HPV, con identificazione dei genotipi, della persistenza del virus nelle donne risultate positive e del tasso di nuove infezioni. Per quanto riguarda la distribuzione dei tipi di HPV nelle lesioni di alto grado nella fascia di screening, in uno studio condotto a Firenze su 117 donne con CIN 2+ identificate nel corso dello screening il 67% presentava HPV-16.

Il vaccino non sostituirà lo screening, ma questo dovrà essere modificato. Il vaccino, inoltre, offrirà l'opportunità di raggiungere più facilmente fasce della popolazione restie a partecipare e fidelizzarsi ad un programma di screening e anche questo è un elemento importante perché è noto che la maggior parte dei tumori si verifica in donne che non si sottopongono al Pap test. Questo, infatti, diminuisce l'incidenza del carcinoma invasivo dell'80% circa se eseguito regolarmente ogni tre anni, mentre il vaccino è in grado di fornire una protezione per il 70% circa dei carcinomi: quindi l'effetto combinato di vaccini e screening (assumendo un effetto indipendente) sarebbe una riduzione del 94%. A parità di numero di donne che si sottopongono a vaccino e a screening, la proporzione di tumori prevenuti è tanto maggiore quante meno sono le donne che non fanno nulla.

Nelle donne immunizzate la sensibilità e la specificità dei test di screening dovranno essere rivalutate. Con la diminuzione dell'incidenza e della prevalenza della malattia sarà importante valutare l'impatto sul numero totale di anormalità citologiche e individuare la migliore strategia di screening in una popolazione vaccinata (età di intervento, tipo di test, intervalli tra i test, procedure di follow-up) per ridurre al minimo procedure non necessarie e i costi. In una situazione di bassa prevalenza diminuisce, infatti, il VPP del Pap test, per cui molte donne sarebbero inviate in colposcopia con una limitata probabilità di avere una lesione. D'altra parte, vi è stato negli ultimi 10 anni un grande interesse sull'uso del test HPV DNA sia come test primario di screening sia come triage di anormalità citologiche borderline. Il test ha mostrato una maggiore sensibilità (20-40%), ma una specificità più bassa (5-10%) del Pap test nell'individuare lesioni di alto grado e cancro. Nell'epoca del vaccino, è ipotizzabile una diversa strategia di screening con l'utilizzo del test più sensibile per primo, seguito da un triage con un test più specifico, cioè uno screening con HPV DNA test e un triage

(delle donne HPV positive) con la citologia. Gli studi in corso consentiranno di valutare con precisione molte delle informazioni per ora soltanto presunte o stimate. Comunque, se il Servizio Sanitario Nazionale offrirà la vaccinazione a determinate classi d'età è ipotizzabile che anche le donne di altre classi d'età si sottopongano a vaccinazione.

La piena integrazione delle politiche vaccinali con politiche di screening passa attraverso la necessaria costituzione di un'anagrafe vaccinale, che sarà tanto più completa quanto più sarà circoscritta ai centri vaccinali. La completezza di questa anagrafe sarà successivamente fondamentale per valutare l'efficacia della strategia di screening e per definire il livello di sovrapposizione delle due popolazioni (vaccinale e di screening). Inoltre, per assistere le donne nel prendere una decisione informata sulla vaccinazione, dovrebbero essere sviluppate adeguate procedure di comunicazione. Sarà inoltre importante valutare l'impatto dei vaccini su altri tumori genitali e non genitali associati all'HPV: da qui, scaturisce la necessità di una sinergia tra i servizi di vaccinazione e quelli di screening per poter individuare, tra le donne invitate allo screening, quelle che si sono sottoposte alla vaccinazione; questo link potrebbe permettere di valutare, nelle donne vaccinate, eventuali modificazioni sulle abitudini allo screening, l'efficacia nella riduzione di malattia e la prevalenza delle infezioni per evidenziare eventuali cambiamenti nella frequenza dei virus oncogeni minori nella popolazione generale e nelle lesioni.

## 1.9. TERAPIA DELLE LESIONI DA HPV

La terapia delle lesioni HPV associate è variabile a seconda del tipo, della sede e delle dimensioni delle lesioni [172]. Numerosi approcci sono stati proposti per la terapia, ma fondamentalmente le metodiche terapeutiche vengono suddivise in due categorie: chirurgiche e farmacologiche, il cui obiettivo finale è comunque lo stesso, vale a dire la distruzione localizzata del tessuto infettato [173, 174].

Le **terapie chirurgiche** comprendono la crioterapia [175], l'elettrocoagulazione, l'elettrobisturi, il laser a CO<sub>2</sub> [176], l'escissione, la diatermocoagulazione.

- ✓ La **crioterapia** si basa sul controllato ma repentino abbassamento della temperatura della lesione mediante azoto liquido. Questo abbassamento della temperatura oltre la soglia di congelamento produce la distruzione selettiva delle lesioni trattate.
- ✓ L'**elettrocoagulazione** è una tecnica che utilizza la corrente ad alta frequenza per creare il calore necessario a bruciare la lesione.
- ✓ Il **laser a CO<sub>2</sub>** sfrutta l'emissione di una luce intensa per vaporizzare la lesione.
- ✓ L'**escissione** di tutta la lesione, per il trattamento delle lesioni interne, consente l'esecuzione di un esame istologico.

Le **terapie farmacologiche** sono prevalentemente ad uso topico ed includono agenti citotossici, cheratolitici e antineoplastici.

- ✓ Gli **agenti cheratolitici** sono acido salicilico, lattico e retinoico. Queste sostanze riducono progressivamente la dimensione della lesione fino ad eliminarla.
- ✓ Gli **agenti citotossici** sono podofillotossina, podofillina, acido tricloroacetico [173]. In particolare, la podofillina è un agente antivirale che esplica il suo effetto citotossico inibendo la metafase, la podofillina è una sostanza caustica.
- ✓ Gli **antineoplastici** sono bleomicina [177] e 5-fluorouracile [178]. La bleomicina è un chemioterapico antineoplastico che impedisce la sintesi del DNA nelle cellule e nei virus ed è iniettata direttamente nella lesione. Il 5-fluorouracile, invece, è un antimetabolita.

Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi relativi al trattamento delle lesioni HPV-correlate attraverso un **nuovo farmaco antivirale**: il Cidofovir [179]. Questo farmaco è risultato efficace nel trattamento topico o interlesionale di diverse infezioni causate da virus a DNA e ha dato risultati ottimali in pazienti immunocompromessi. E' stato inoltre dimostrato che la concomitante somministrazione di dosi ridotte di Cidofovir e IFN  $\alpha$  determina una più rapida riduzione dell'attività proliferativa cellulare.

Alle predette categorie va inoltre aggiunta una terza, più eterogenea, comprendente l'impiego dell'**interferone alfa** [180] o di **immunomodulatori** come l'Imiquimod (Meda Pharma SpA, Francia) [181].

Spesso, però, anche dopo trattamenti aggressivi, si riesce solo a garantire l'eliminazione della patologia e dei sintomi, ma non del virus, con conseguente comparsa di recidive anche dopo un periodo di tempo breve.

## **1.10. I GENOTIPI AD ALTO RISCHIO ONCOGENO: HPV-16 E HPV-**

### **18**

#### **L'EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE DA HPV-16**

Da numerosi studi condotti a livello mondiale sulla prevalenza dei tipi di HPV, associati a tumori, in donne della popolazione generale, risulta evidente che, tra i tipi ad alto rischio, il genotipo 16 è quello predominante, con tassi variabili in rapporto alla zona geografica: dal 52% in Asia al 58% in Europa [182, 183].

La percentuale dei casi L-SIL attribuibili ad HPV-16 va dal 16% (Africa) al 29% (Europa), mentre quella delle H-SIL dal 34% (Asia) al 52% (Europa) [182, 184].

È stato stimato che HPV-16 ricorre nel 50-60% dei casi di tumore della cervice uterina [183, 185] e nella maggior parte dei casi degli altri tumori ano-genitali e orofaringei [186], risultando così il tipo maggiormente cancerogeno. Esso è capace di produrre infezione persistente più frequentemente rispetto agli altri tipi e, poiché la persistenza è predittiva di evoluzione maligna, HPV-16 è inequivocabilmente associato all'insorgenza di lesioni precancerose e alla progressione a tumore. È stato stimato che a circa il 40% delle donne con infezione persistente da HPV-16 viene diagnosticato uno stadio precanceroso entro 5 anni [187].

#### **L'EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE DA HPV-18**

Differentemente da HPV-16, il genotipo 18 circola all'interno della popolazione con una prevalenza più bassa. A livello mondiale si stima che, nella popolazione generale con età compresa tra 18-65 anni, HPV-18 sia presente nel 7,3-9,1% delle infezioni da papilloma virus [77, 111]. Studi condotti in Italia confermano questi dati, riportando valori di prevalenza tra i soggetti HPV-positivi del 7-8% [188, 189].

Diversi studi recenti mostrano come la frequenza del genotipo 18 aumenti notevolmente con l'aumentare del grado di lesione epiteliale associata: si passa dal 6,1% in pazienti con lesioni di basso grado al 15,9% riscontrato in soggetti con H-SIL e cancro cervicale [111, 190].

Nonostante l'inferiore frequenza di infezione nella popolazione generale, la prevalenza di HPV-18 tra soggetti portatori di tumori alla cervice uterina o di altri tumori associati ad infezione da HPV si attesta fra il

16% e il 20%, posizionando così il genotipo 18 al 2° posto nelle classifiche mondiali [191].

HPV-18 è stato associato in letteratura a forme estremamente aggressive di CIN e carcinomi cervicali altamente invasivi. Tra i soggetti affetti da adenocarcinoma e adenocarcinoma squamoso la prevalenza di HPV-18 supera anche quella di HPV-16, attestandosi tra il 37% e l'86% a seconda degli studi considerati [191].

### **IL PROBLEMA DELLE VARIANTI**

Correntemente, una variante di HPV è definita come una specie virale avente una similarità nucleotidica maggiore del 98% rispetto ad una sequenza d'interesse. Negli ultimi anni lo studio delle varianti di HPV ha assunto una notevole importanza nella determinazione del rischio cancerogeno e per lo sviluppo futuro di un vaccino.

Essendo HPV-16 e HPV-18 i target di diversi vaccini profilattici e terapeutici, varianti intratipiche di tali genotipi potrebbero influenzare la risposta immunitaria, rendendo vani i tentativi d'attuare un'efficiente campagna vaccinale. Inoltre, dal momento in cui i differenti tipi di HPV hanno mostrato un diverso potenziale oncogenico, è ragionevole ipotizzare che anche le varianti intratipiche siano caratterizzate da una specifica oncogenicità.

L'analisi molecolare condotta su campioni provenienti da pazienti affetti da epidermodisplasia verruciforme associata all'infezione da HPV [192] ha dimostrato la presenza di variazioni nucleotidiche relative ad HPV-5 e ad HPV-8.

Per quanto riguarda le varianti di HPV mucosali, sono stati condotti diversi studi volti a determinare le relazioni filogenetiche intra ed intertipiche tra le varianti, con particolare attenzione alle varianti di HR-HPV quali HPV-16 ed HPV-18.

### **LE VARIANTI GEOGRAFICHE DI HPV-16**

Varianti geografiche di HPV-16 si riscontrano analizzando la sequenza del gene codificante per la proteina L1; tuttavia, recentemente, si è evidenziata una maggiore differenza intratipica (5%) quando l'analisi genomica viene condotta a livello della regione regolatoria LCR [22, 193]. Tali varianti sono stabili e non sono soggette a frequenti ricombinazioni [194].

Sulla base delle differenze nucleotidiche riscontrate a livello della regione regolatoria LCR e del gene E5 [195], le varianti molecolari di HPV-16 sono suddivise in 5 gruppi che riflettono la loro distribuzione geografica (*cluster* geografici). Studi filogenetici hanno dimostrato che il virus HPV si è coevoluto con la specie umana [196] e, pertanto, i 4 cluster sono riconducibili ai continenti in cui sono stati evidenziati: Europeo (E) contenente anche la sotto-classe Asiatica (As), Asiatico-Americano (AA), Africano-1 (Af1) e Africano-2 (Af2).

In particolare, la variante E, comprendente la sottoclasse *Asiatic* (As), sembra predominare in Europa; la variante AA risulta maggiormente diffusa in America centrale e meridionale e in Spagna; Af-1 ed Af-2 si individuano con maggior frequenza nei campioni provenienti dall'Africa.

Probabilmente il ritrovamento della variante AA in Spagna è stata la conseguenza della colonizzazione da parte dei *conquistadores* spagnoli, di ritorno dall'America. Ciò dimostrerebbe che la distribuzione geografica delle varianti di HPV potrebbe essere influenzata da diversi fattori, tra i quali gli effetti delle colonizzazioni, la coevoluzione dei tipi di HPV con le razze umane, i *parterns* di migrazione e la trasmissibilità del virus.

L'analisi di altre sequenze genomiche di HPV-16 (E6, L1 ed L2) hanno dimostrato una forte covariazione intergenica all'interno di isolati singoli di HPV-16 ed hanno suggerito che variazioni nucleotidiche in una determinata regione genomica possono essere utilizzate per distinguere classi e subclassi di varianti. Per quanto riguarda la variante Europea sono state per esempio osservate variazioni di sequenza all'interno della regione E6 in corrispondenza del nucleotide 350, che consentono la suddivisione filogenetica in ulteriori sottoclassi: E-350T (variante E avente una T in posizione 350) ed E-350G (avente una G al nucleotide 350). Studi epidemiologici longitudinali, di coorte e caso-controllo, condotti allo scopo di valutare possibili differenze di infettività e patogenesi delle diverse varianti Europee e non-Europee hanno dimostrato che le infezioni con varianti non-Europee hanno una maggior tendenza a diventare persistenti [197] e che risultano associate ad un rischio maggiore per lo sviluppo di lesioni pre-invasive (H-SIL e CINIII) [198-200]. I risultati di alcuni studi permettono di comprendere meglio l'associazione tra varianti non-Europee di HPV-16 ed elevato potenziale oncogeno: la diversa patogenicità sembrerebbe dipendere dall'alterazione di elementi codificanti o regolatori all'interno del genoma virale. Si possono riscontrare alterazioni in elementi *cis*-responsivi in grado di variare il

tasso di trascrizione e replicazione virale. In vitro è stata dimostrata la variabilità nucleotidica nella regione LCR a livello dei siti di legame per fattori di trascrizione cellulari; questo può comportare un aumento, di circa 4 volte, dell'attività trascrizionale del promotore P<sub>97</sub> e quindi dell'espressione dei geni virali, in particolare degli oncogeni [201]. Nelle varianti AA, ad esempio, si osserva una ridotta trascrizione del gene E2, risultante in una incrementata produzione delle oncoproteine E6 ed E7 [202]. Infine, l'efficacia di replicazione delle varianti non-Europee è più alta rispetto a quelle Europee [203].

Tra le varianti di HPV-16 cambiamenti aminoacidici sembrano alterare la funzione a livello delle proteine E6 ed E7, ad esempio, nelle varianti AA, la proteina E6 induce più attivamente la degradazione della proteina p53 [204]. Mutazioni aminoacidiche della proteina L1, invece, potrebbero causare cambiamenti conformazionali a livello degli epitopi immunodominanti così da alterare l'efficienza della risposta immunitaria [205].

## **LE VARIANTI GEOGRAFICHE DI HPV-18**

Un numero sempre crescente di ricerche si è occupato negli ultimi anni di studiare la variabilità intra-tipica di HPV-18 al fine valutare filogeneticamente la circolazione di varianti di questo genotipo nella popolazione mondiale. È stata così osservata la presenza di 2 principali cluster geografici: Europeo (E) e non Europeo (contenente le varianti Africane e quella Asiatico-Americano) [22].

Lo studio delle varianti di HPV-18 ha portato ulteriori evidenze circa la sincrona origine di tutti i papillomavirus, avvenuta in Africa. Si nota, infatti, confrontando le varianti Africane di HPV-18 con le varianti Africane del genotipo filogeneticamente più vicino, HPV-45 (entrambi appartenenti alla specie 7 di HPV), come queste siano più simili tra loro che con le altre varianti non africane, anche intra-specifiche [182, 183].

Inizialmente, sia per il genotipo 16 che per il 18, gli alberi filogenetici intra-tipici venivano costruiti basandosi sulle sequenze LCR del genoma di HPV, poiché ritenute maggiormente variabili a livello intra-tipico (5% di variazioni nucleotidiche contro il 2% relativo al gene L1) e stabili nella popolazione [22, 193, 194]. Studi successivi hanno però mostrato che alberi costruiti sulla base di altre regioni

geniche di interesse, quali E6 e L1, evidenziano gli stessi 2 cluster osservati per LCR [183].

Studi epidemiologici longitudinali, di coorte e caso-controllo, condotti allo scopo di valutare possibili differenze di infettività e patogenesi delle diverse varianti Europee e non-Europee hanno dimostrato che le infezioni con varianti HPV-18 non-Europee hanno una maggior tendenza a diventare persistenti [197] e che risultano associate ad un rischio maggiore per lo sviluppo di lesioni preinvasive (H-SIL e CINIII), analogamente a quanto osservato per HPV-16 [198].

Diversi studi hanno mostrato come HPV-18 risulti sensibilmente più efficiente di HPV-16 nel processo di immortalizzazione cellulare. Ciò sembra essere dovuto alla maggiore capacità di HPV-18 di integrarsi nella cellula ospite [206-208]. L'elemento virale responsabile della maggiore efficienza di immortalizzazione di HPV-18 è stato mappato nei siti di regolazione dei geni E6 e E7 presenti nella regione LCR [206, 207]. Uno studio del 1998 ha mostrato come mutazioni puntiformi e spontaneamente ricorrenti nei motivi regolatori di LCR portino ad un'aumentata attività del promotore di E6/E7 [209].

### **PROTEINA L1 ED "ESCAPE MUTANTS" DI HPV-16 E HPV-18**

La proteina L1 (56-60 KD) rappresenta la principale proteina antigenica dei papillomavirus ed è altamente conservata.

Essendo la componente proteica maggiormente rappresentata a livello capsidico, essa è anche definita "proteina maggiore del capsido". Quando espressi in sistemi artificiali, i monomeri di L1, grazie ad interazioni dimeriche e trimeriche, sono in grado di assemblarsi in VLPs (*Virus Like Particles*); ogni VLP risulta costituita da 72 pentameri di L1 [210].

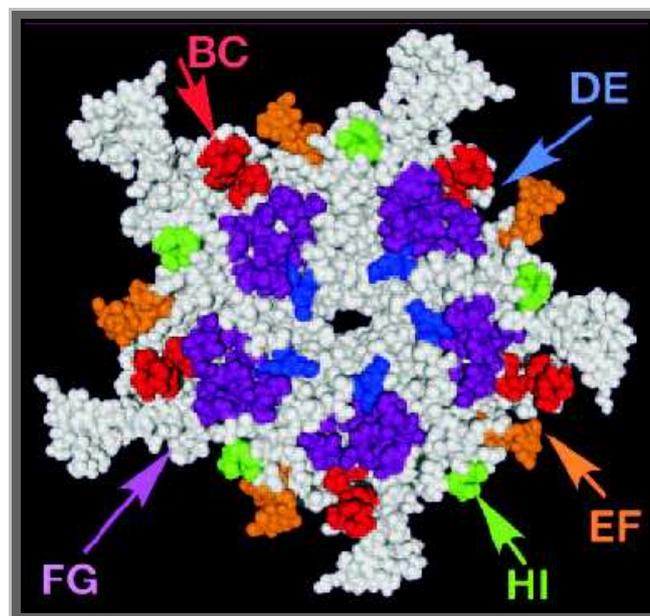
Oggi le VLPs ricoprono un grande interesse per lo studio di vaccini profilattici contro HPV. Tramite l'immunizzazione di specie murine con VLPs, infatti, è stato possibile testare l'azione neutralizzante di anticorpi monoclonali e policlonali diretti contro i principali tipi di HPV.

Diversi studi hanno dimostrato che il riconoscimento anticorpale dipende dal legame con particolari epitopi conformazionali espressi sulla superficie capsidica.

L'allineamento di sequenza delle proteine L1 di 52 tipi di HPV diversi [211] ha dimostrato un'elevata similarità di sequenza ad eccezione di 5 regioni ipervariabili, della lunghezza di circa 10-30 aminoacidi e

coinvolte nella formazione di *loops* immunodominanti denominati BC, DE, EF, FG, HI (Figura 8). Le mutazioni aminoacidiche all'interno di una di tali regioni potrebbero comportare la perdita dell'immunogenicità. Esiste, inoltre, un dominio altamente conservato denominato  $\alpha$ -4 fondamentale per la formazione delle VLPs *in vitro*.

Nell'epoca vaccinale appena iniziata è di fondamentale importanza monitorare continuamente le possibili variazioni aminoacidiche all'interno degli epitopi immunodominanti della proteina L1 e nel dominio  $\alpha$ -4 causate dalla pressione immunitaria dell'ospite in grado di far emergere varianti dei genotipi vaccinali in grado di evadere la risposta immunitaria vaccino-indotta (*varianti escape*), inficiando così l'efficacia della strategia di prevenzione primaria.



**Figura 8:** Modello molecolare della proteina L1 di HPV-16; sono evidenziate le posizioni dei siti immunoepitopici.

Un recente studio [212] ha messo in evidenza la presenza di 2 codoni d'inizio (ATG) a distanza di 78 nucleotidi, uno in corrispondenza del nucleotide 5559 e l'altro in posizione 5637. Sebbene la trascrizione del gene negli strati superficiali dell'epitelio abbia inizio prevalentemente dal nucleotide 5559, si è osservato che la formazione di VLPs *in vitro* avviene efficacemente solo quando la trascrizione ha inizio dal nucleotide 5637. In aggiunta, l'analisi di sequenza di diversi tipi di HPV associati a particolari manifestazioni cliniche, ha rivelato che il prodotto genico L1 dei tipi virali associati a carcinomi cervicale è generalmente più lungo rispetto a quello dei tipi a basso rischio

oncogeno. Tali osservazioni hanno portato ad ipotizzare che la trascrizione del gene L1 più lungo giochi un ruolo importante nello sviluppo del cancro alla cervice uterina.

## 1.11. CHLAMYDIA TRACHOMATIS

### CLASSIFICAZIONE

Le Clamidiose costituiscono un gruppo di microrganismi coccoidi gram-negativi intracellulari obbligati, richiedono quindi, per compiere il proprio ciclo vitale, di cellule viventi in cui moltiplicarsi [213]. Questo parassitismo intracellulare obbligato e le piccole dimensioni avevano fatto considerare per molto tempo le clamidiose come dei grossi virus. In realtà le clamidiose differiscono dai virus in quanto possiedono entrambi gli acidi nucleici (DNA e RNA), si moltiplicano per scissione binaria e sono sensibili a molti antibiotici a largo spettro.

Il nome *Chlamydia* si riferisce ad una peculiare struttura superficiale di questi microrganismi, cioè un "mantello" con caratteristiche molto simili alla membrana esterna dei batteri gram-negativi.

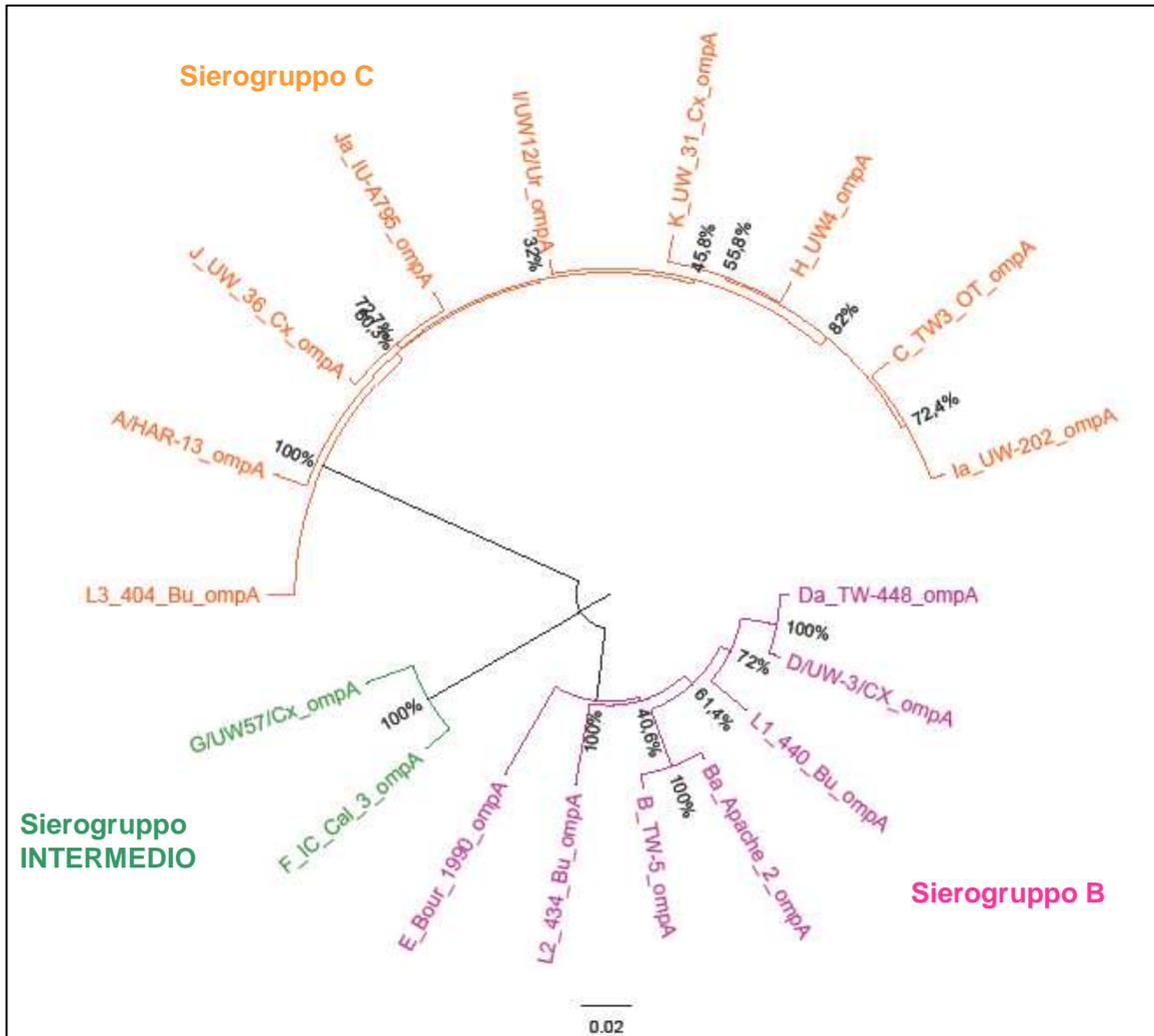
Le Clamidiose appartengono al regno dei Bacteria, phylum *Chlamydiae*, ordine *Chlamydiales*, famiglia *Chlamydiaceae*, genere *Chlamydia* [214]. Gli organismi del genere *Chlamydia* sono parassiti obbligati con limitata capacità metabolica che formano un phylum a sé stante di batteri. Si riconoscono quattro specie di *Chlamydia* in grado di infettare l'uomo: *C. psittaci*, l'agente della psittacosi; *C. trachomatis*, l'agente del tracoma e di diverse malattie dell'apparato genitale; *C. pneumoniae*, causa di diverse sindromi respiratorie; *C. pecorum*, il cui ruolo come patogeno però non è ancora chiaro [215].

Per un certo periodo di tempo si è pensato che le clamidiose fossero "parassiti di energia", in grado di ottenere dai loro ospiti non solo intermedi metabolici ma anche ATP. Questa ipotesi è stata messa in dubbio a seguito del sequenziamento del genoma di *C. trachomatis*. Esso contiene infatti i geni per la sintesi di ATP che sono facilmente riconoscibili.

La proteina maggiore di membrana (MOMP) di *Chlamydia trachomatis* contiene specifici antigeni che differenziano i ceppi di clamidia in sierotipi (sulla base della cross-reattività antigenica nella microimmunofluorescenza) o genotipi (sulla base del sequenziamento del gene *OmpA*) [216, 217].

Sulla base delle similarità a livello di MOMP è stato possibile individuare 18 sierotipi suddivisi in 3 sierogruppi: il gruppo B che comprende i serovar B, Ba, D, Da, E, L1, L2 e L2a; il gruppo intermedio I che comprende i serovar F e G ed infine il gruppo C che comprende i

serovar I, Ia, J, K, C, A, H e L3. I sierotipi A, B, Ba C causano infezioni oculari; i sierotipi D, Da, E, F, G, H, I, Ia Ja, K causano infezioni ano-genitali; ed infine, i sierotipi L1, L2, L2a e L3 causano il Linfogramuloma venereo (Figura 9) [217-219].



**Figura 9.** Albero filogenetico di *C. trachomatis*: sierograppo B (serovar B, Ba, D, Da, E, L1 e L2); sierograppo Intermedio (serovar F e G); sierograppo C (serovar I, Ia, J, Ja, K, C, A, H e L3).

### MORFOLOGIA E STRUTTURA

La *Chlamydia trachomatis* ha una morfologia sferoidale. Presenta un involucro esterno costituito da una membrana esterna e da una membrana interna: questa presenta, sul versante esocellulare una componente lipopolisaccaridica (LPS); manca la componente peptidoglicana, sostituita da uno strato di proteine ricche in cisteina (CRP) [220]. È importante poi la presenza di una proteina denominata MOMP, la proteina maggiore di membrana, che gioca un ruolo fondamentale nel mantenere l'integrità

strutturale dell'organismo [221, 222]. Formando una struttura trimerica MOMP può agire come una citoadesina putativa nel promuovere le interazioni non specifiche con le cellule dell'ospite [223, 224]. Grazie a questa struttura, le clamidie hanno la capacità di bloccare la fusione tra il fagosoma e il lisosoma, potendo così sopravvivere all'interno della cellula infettata. Durante la replicazione, MOMP può agire come una porina [225], piegata in una struttura che contiene 5 domini costanti di transmembrana, e 4 domini altamente variabili esposti sulla superficie [226-228].

MOMP possiede inoltre epitopi specie-specifici e sierovarianti-specifici [229-232] che sono capaci di eludere sia la risposta cellulare che umorale, rendendo questo antigene dominante un potenziale candidato per lo sviluppo di vaccini e strategie terapeutiche [233-236].

## **GENOMA**

Il materiale genetico di questo batterio è costituito da DNA genomico circolare di 1,044,352 bp, che codifica per circa 875 proteine, ed un plasmide criptico di circa 7,5 kpb, presente in 7-10 copie per batterio, che talvolta viene perso in alcuni ceppi [237].

Poiché le variazioni all'interno della sequenza nucleotidica dei plasmidi di *C. trachomatis* sono <1% questi sono considerati molto conservati. Tutti i plasmidi hanno una lunghezza di circa 8 Kb e contengono 8 *Open Reading Frame* (ORF) che codificano per diverse proteine costituite ognuna da più di 100 aminoacidi, intervallate da brevi sequenze non codificanti [237, 238].

È interessante notare che all'interno della specie *trachomatis* il DNA plasmidico sia più simile tra i diversi ceppi di quanto non lo sia il DNA cromosomico.

Il plasmide di *Chlamydia trachomatis* è il bersaglio privilegiato per la diagnosi di infezione mediante metodi molecolari.

Per convenzione la sequenza plasmidica è numerata a partire dall'unico sito di restrizione per BamHI in modo tale che l'ORF1 si trovi subito dopo il sito di inizio della replicazione (ORI) [239]. Entrambi i filamenti plasmidici contengono regioni codificanti, e in ogni caso, l'ORF2 è situata sul filamento complementare. Tutti i plasmidi contengono quattro *tandem repeat* di 22 bp nella regione intragenica tra ORF8 e ORF1 [240, 241].

Alcuni ceppi mancano di questi plasmidi e quindi mancano della possibilità di essere individuati mediante le routinarie tecniche molecolari. È nota l'esistenza di ceppi senza plasmidi; questi sono caratterizzati da un'insolita morfologia e non presentano caratteristiche di resistenza agli antibiotici. Tuttavia, il fatto che questi ceppi esistono dimostra che il plasmide non è essenziale per la sopravvivenza della *C. trachomatis* [242, 243].

Sul sito dell'NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) sono reperibili le informazioni relative al genoma di *Chlamydia trachomatis*:

Genome Info:	Features:	BLAST homologs:	Links:	Review Info:
Refseq: <a href="#">NC_012686</a>	Genes: <a href="#">936</a>	COG	<a href="#">Genome Project</a>	Publications: <a href="#">[1]</a>
GenBank: <a href="#">FM872308</a>	Protein coding: <a href="#">875</a>	<a href="#">TaxMap</a>	<a href="#">Refseq FTP</a>	Refseq Status: <b>PROVISIONAL</b>
Length: <b>1,044,352 nt</b>	Structural RNAs: <a href="#">43</a>	<a href="#">TaxPlot</a>	<a href="#">GenBank FTP</a>	Seq Status: <b>Completed</b>
GC Content: <b>41%</b>	Pseudo genes: <b>18</b>	<a href="#">GenePlot</a>	<a href="#">BLAST</a>	Sequencing center: <a href="#">Wellcome Trust Sanger Institute</a>
% Coding: <b>88%</b>	Others: <b>18</b>	<a href="#">gMap</a>	<a href="#">TraceAssembly</a>	Completed: <b>2009/05/19</b>
Topology: <b>circular</b>	Contigs: <b>None</b>		<a href="#">CDD</a>	Organism Group
Molecule: <b>DNA</b>			Other genomes for species: <a href="#">11</a>	

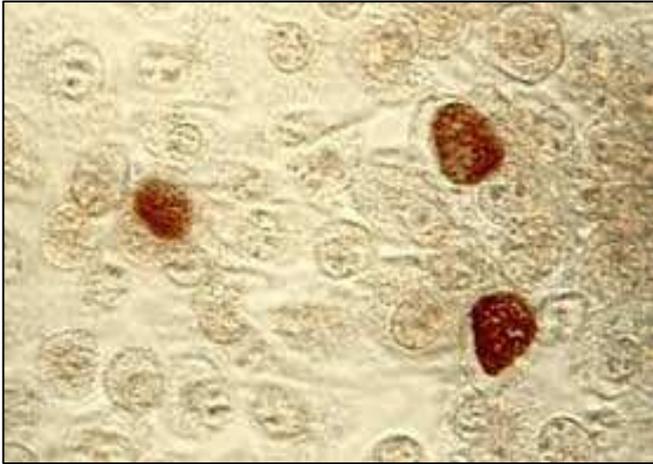
**Tabella 4.** Caratteristiche del genoma di *Chlamydia trachomatis* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## CICLO REPLICATIVO

Le clamidie presentano due distinte forme biologiche, denominate corpi elementari e corpi reticolari [220]. I corpi elementari sono quelli di dimensioni minori, e costituiscono la forma extracellulare. Sono altamente infettanti. Quelle iniziali e reticolari sono quelle di dimensioni maggiori e rappresentano la forma intracellulare e, al contrario, sono scarsamente infettanti. La forma infettante delle clamidie (corpo elementare) è specificatamente adatta alla sopravvivenza extracellulare e si lega a specifici recettori presenti sulla superficie della cellula eucariotica, in cui penetra mediante un processo di fagocitosi attuato dalla cellula stessa [239].

Un ciclo replicativo completo si svolge in 48-60 ore. Le clamidie si moltiplicano nel citoplasma delle cellule ospiti attraverso la formazione di particolari inclusioni intracellulari citoplasmatiche che contengono glicogeno [244]. Le inclusioni intracellulari sono costituite da microcolonie inglobate in un vacuolo delimitato da una membrana derivata dalla cellula ospite (Figura 10). Queste inclusioni si dispongono attorno al nucleo della cellula dove all'interno del vacuolo il corpo elementare, ingrandendosi e riorganizzandosi, si trasforma nel corpo reticolare, di

forma rotondeggiante, che è adatto all'ambiente intracellulare, fuori dal quale ha scarse capacità di sopravvivenza. I corpi reticolari si moltiplicano attivamente dentro la cellula per scissione binaria e, successivamente, si riorganizzano nuovamente rimpicciolendosi e trasformandosi nei corpi elementari; questi si liberano nell'ambiente per rottura della cellula infetta e iniziano un nuovo ciclo [245].



**Figura 10.** *Inclusioni di Chlamydia trachomatis.*

## **1.12 L'INFEZIONE DA CHLAMYDIA TRACHOMATIS**

### **STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE**

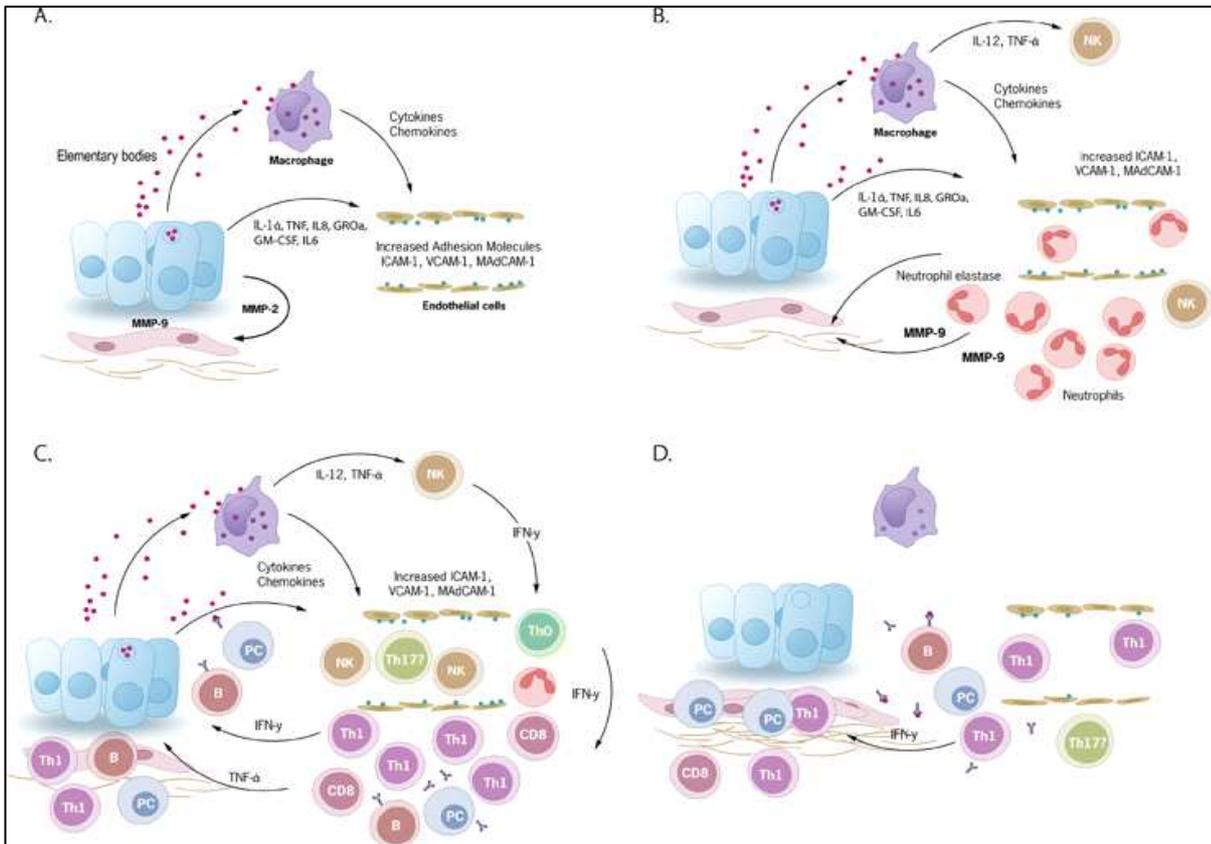
La storia naturale dell'infezione da *Chlamydia trachomatis* non è completamente compresa. L'infezione provocata da questo batterio è asintomatica nel 70% dei casi per le donne e nel 50% dei casi per gli uomini. Anche se la maggior parte delle infezioni si risolvono spontaneamente, senza alcun trattamento, altre possono persistere per lunghi periodi e progredire verso una complicanza [246]. Nelle femmine la *Chlamydia trachomatis* infetta inizialmente la cervice e l'uretra dove può causare cerviciti e uretriti. Dalla cervice i batteri possono risalire al tratto superiore dell'apparato genitale dove può causare la malattia pelvica infiammatoria con o senza sintomi. Poiché la maggior parte delle infezioni genitali da *C. trachomatis* sono asintomatiche, i programmi di controllo, quando esistono, sono basati principalmente su screening attuati per la loro rilevazione. Questi programmi hanno l'obiettivo di ridurre il numero delle conseguenze dell'infezione da *C. trachomatis* identificando le donne infette e trattandole prima che l'infezione progredisca in un'infiammazione clinicamente rilevabile e/o riducendo la trasmissione nella popolazione e quindi, riducendo il numero di nuovi infetti e le conseguenze ad esse associate [247]. Studi sulla storia naturale dell'infezione da *Chlamydia trachomatis* sono scarsi e ancora non risolutivi per la comprensione del processo che porta dall'infezione allo sviluppo della patologia.

### **PATOGENESI DELL'INFEZIONE E CO-INFEZIONE CON HPV**

L'infezione da *Chlamydia trachomatis* rappresenta uno dei fattori di rischio che favoriscono l'evoluzione e lo sviluppo del cervicocarcinoma causato da HPV. Sebbene non si pensi abbia un effetto diretto sul DNA dell'ospite o sulla trascrizione dei geni per l'HPV, sono stati descritti diversi meccanismi biologici con i quali *C. trachomatis* può aumentare il rischio di cancro cervicale [73]. Può avere effetti anti-apoptotici [248]: la resistenza delle cellule infette all'apoptosi assicura la persistenza dell'infezione da *C. trachomatis*. Questi effetti anti-apoptotici possono tradursi in un'aumentata persistenza delle cellule epiteliali che sono co-infettate con HPV e/o ridurre la probabilità di morte cellulare con conseguente sviluppo di anomalie cromosomali,

aumentando il grado di neoplasia cervicale [249, 250]. Inoltre, la *C. trachomatis* può causare lo scollamento delle cellule epiteliali cervicali in seguito alla rottura a livello dell'epitelio del legame caderina-catenina, e aumentare così l'esposizione delle cellule basali all'HPV [251]. Attraverso la modulazione dei fattori immunitari può aumentare il rischio d'infezione con HPV e la sua persistenza: *C. trachomatis* inibisce l'espressione dell'interferone  $\gamma$ -inducibile del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC-II) [252] come l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I). Alterazioni quantitative e qualitative nell'espressione di MHC I portano alla stimolazione delle cellule natural killer (NK). La *C. trachomatis* può, tuttavia, inibire la funzione delle NK e ciò si traduce in una diminuzione delle capacità litiche delle stesse, una ridotta produzione di  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{INF}\gamma$  e una diminuzione della citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (Figura 11). Studi *in vitro* suggeriscono che la risposta infiammatoria nei confronti della *Chlamydia* inizia e viene sostenuta attivamente dalle cellule epiteliali infette dell'ospite [253]. La risposta ad una prima infezione con la *C. trachomatis* si manifesta entro 1-2 giorni dal contagio ed è caratterizzata da un'infiltrazione mucosale di neutrofili, in grado di uccidere i corpi elementari, e un modesto numero di monociti. In seguito, nel sito di infezione si accumulano le cellule T che giocano un ruolo importante nel controllo dell'infezione. Le cellule epiteliali secernono chemochine che richiamano i leucociti infiammatori verso il sito di infezione e citochine che inducono e portano avanti la risposta cellulare infiammatoria, e questi mediatori inducono un danno diretto ai tessuti. Al momento della re-infezione il rilascio di chemochine da parte della cellula ospite guida il reclutamento di cellule immunitarie clamidia-specifiche [254]. L'infezione dell'epitelio del tratto genitale si traduce nella produzione dell'interleuchina-1 (IL-1), del *tumor necrosis factor* (TNF), IL-8 e IL-6, che inducono l'aumento dell'espressione delle molecole di adesione endoteliali che aiutano al richiamo delle cellule immunitarie [255]. Anche i macrofagi che risiedono nel tessuto contribuiscono al rilascio di citochine e chemochine. Le cellule epiteliali infette rilasciano le MMPs (metalloproteine) che contribuiscono alla proteolisi e al rimodellamento del tessuto. La produzione di  $\text{IFN-}\gamma$  da parte delle natural killer (NK) guida le cellule T CD4 verso il differenziamento nella sottopopolazione Th1. Gli anticorpi rilasciati dalle plasmacellule inattivate dei corpi

elementari extracellulari e la produzione di IFN- $\gamma$  inibisce la replicazione intracellulare della chlamydia. Dopo che l'infezione si è risolta, l'infiammazione si attenua, ma come risultato finale è possibile che si formi una cicatrice persistente.



**Figura 11.** Patogenesi dell'infezione genitale da *Chlamydia trachomatis* (Darville et al., *J Infect Dis* 2010, 201 Suppl 2:S114-25).

## 1.13 MANIFESTAZIONI CLINICHE DELL'INFEZIONE DA CHLAMYDIA

### TRACHOMATIS

#### TRACOMA



Si tratta di una cheratocongiuntivite cronica contratta per contagio interumano diretto, caratterizzata da ipertrofia follicolare, danno corneale e cicatrici congiuntivali, che può portare anche alla cecità [256]. È causata dai sierotipi da A a C e Ba.

#### INFEZIONI UROGENITALI

Sono causate principalmente dai sierotipi da D a K e sono la causa tra le più comuni infezioni sessualmente trasmesse a livello mondiale [217]. L'infezione urogenitale da *Chlamydia* è stata definita "epidemia silente" dal momento che può persistere per anni senza causare sintomi fino a che non si manifestano complicazioni e poi il trattamento risulta insufficiente nel bloccare il danno permanente.

Infatti, molte infezioni sono asintomatiche, più nelle donne rispetto agli uomini [257]. I sintomi iniziali includono secrezioni mucose dal pene e dalla vagina e una sensazione di bruciore quando si urina. Se l'infezione diventa più profonda, i sintomi nelle donne si traducono in un dolore al basso ventre, dolore inusuale durante il rapporto sessuale e sanguinamento nel periodo inter-mestruale. Nell'uomo un'infezione più profonda può portare a sintomi come dolore e gonfiore dei testicoli.

Nelle donne le complicazioni di un'infezione da *Chlamydia* non trattata sono più comuni e più gravi rispetto a quelle degli uomini e vengono denominate comunemente malattia pelvica infiammatoria (PID), termine generico per indicare le infezioni dell'utero, delle tube di Fallopio e delle ovaie. La PID causa cicatrizzazione e fibrosi dei tessuti colpiti dall'infezione. Ciò può bloccare o interrompere il normale movimento della cellula uovo e portare ad una gravidanza extrauterina, che può evolvere in emorragia interna, sepsi e può portare anche a morte se non diagnosticata in tempo. Più spesso la PID può causare la completa ostruzione delle tube di Fallopio impedendo allo sperma di raggiungere

l'uovo, causando così infertilità. La PID può portare anche ad un dolore pelvico cronico [258, 259]. Le complicanze nell'uomo sono più rare, ma l'infezione può trasmettersi ai testicoli e causare epididimite, la quale, se non viene trattata, può portare all'infertilità. [260, 261].

### **LINFOGRANULOMA VENEREO**



Malattia sistemica trasmessa per contagio sessuale, causata dai sierotipi da L1 a L3 [262].

Il quadro clinico presenta lesioni primarie, secondarie e terziarie. Le lesioni primarie possono essere di vari tipi: papule, ulcere o erosioni; sono generalmente di breve durata e spesso passano inosservate. Le lesioni secondarie costituiscono le manifestazioni più frequentemente osservate dai clinici e sono rappresentate dall'infiammazione e dall'ingrossamento dolente dei linfonodi inguinali, che possono successivamente subire una suppurazione e rompersi. Le lesioni terziarie derivano dall'obliterazione cronica dei vasi linfatici nella zona ano-genitale con conseguente elefantiasi degli organi genitali, fistole, stenosi rettali e proctiti [263].

#### **1.14. VIE DI TRASMISSIONE**

La *Chlamydia trachomatis* usa le stesse vie di trasmissione dell'HPV. Si trasmette attraverso il contatto sessuale, mediante il seme o le secrezioni vaginali e tramite la via verticale, da madre a figlio, causando nel neonato patologie oculari e respiratorie [264]. Così come per tutte le altre infezioni sessualmente trasmissibili, anche per l'infezione da *Chlamydia trachomatis*, l'uso del preservativo limita notevolmente la trasmissione, anche se non elimina del tutto il rischio [265].

## 1.15 EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE DA *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

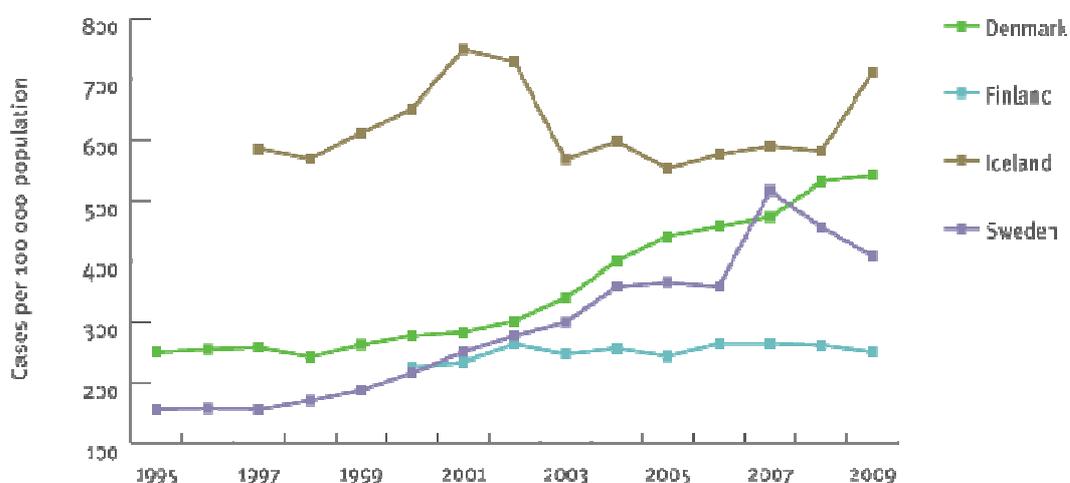
L'OMS stima che ogni anno nel mondo si verificano 92 milioni di nuovi casi di infezione da *C. trachomatis* [10]. Di questi, 3-4 milioni si verificano negli Stati Uniti, 5 milioni nell'Europa occidentale e 16 milioni nell'Africa sub-sahariana [2,14,216].

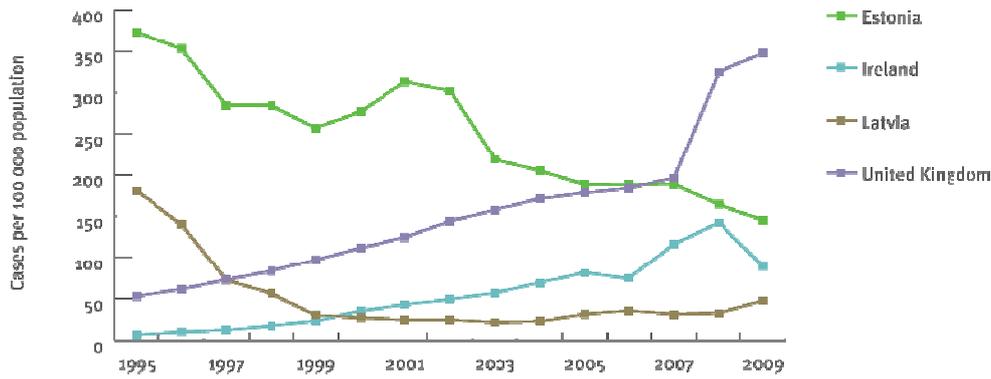
L'asintomaticità è senza dubbio la ragione principale per la quale l'infezione da *Chlamydia trachomatis* rappresenta oggi un problema sanitario di notevole impatto a livello mondiale. Circa il 70% delle infezioni sostenute da tale patogeno rimane asintomatico per esordire, a distanza di tempo, con una complicanza [259].

La questione si fa tanto più spinosa se consideriamo che la popolazione maggiormente colpita dall'infezione risulta essere quella degli adolescenti/giovani/adulti (15-25 anni), che costituiscono una fascia particolarmente a rischio.

Secondo un'indagine condotta dall'ECDC nel corso di 20 anni (1990-2009), a cui hanno partecipato attivamente 23 Nazioni europee, peraltro con metodi e regolamenti di notifica molti diversi, l'incidenza dell'infezione da *C. trachomatis* ha mostrato un trend crescente un po' ovunque ad eccezione di Estonia e Lituania (Figura 12) [13].

Nel 2009 di tutti i circa 344 mila casi riportati dai 23 Paesi membri, l'88% proveniva da soli 4 Paesi, quali: Danimarca, Norvegia, Svezia e Regno Unito.

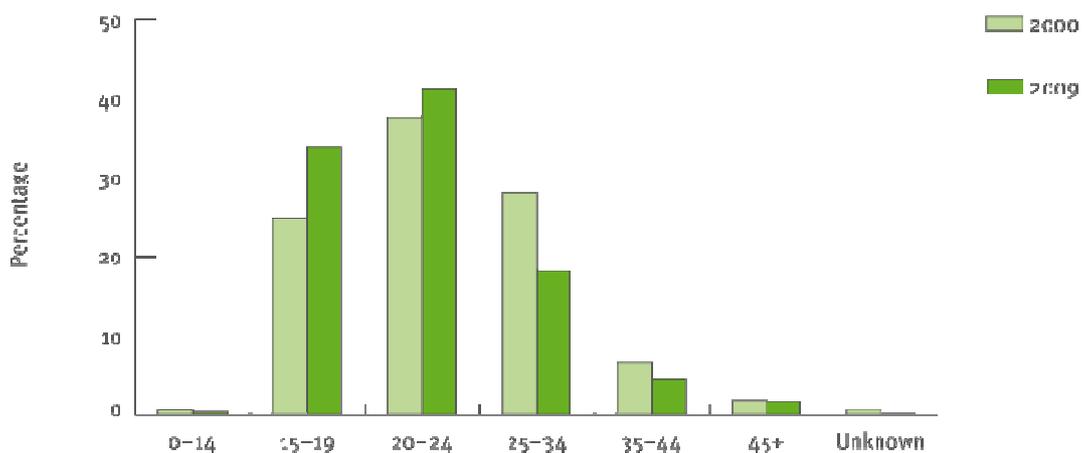




**Figura 12.** Numero di casi di *C. trachomatis* per 100000 abitanti negli stati membri dell'UE/EEA dal 1995 al 2009.

Ancora una volta la fascia di età più colpita è quella giovanile (20-24 anni) in cui si verificano il maggior numero di casi di infezione riportati pari al 41% nel 2009 e al 38% nel 2000, come mostrato in Figura 13 [266]. Il secondo gruppo più numeroso è quello dei giovani nella fascia d'età 15-19 anni, pari al 34% degli infetti nel 2009 e del 25% nel 2000. Quindi nel 2009 circa il 75% di tutti i casi riportati apparteneva alla fascia d'età 15-24 anni.

Il rapporto donne-uomini infettati risulta pari a 1,5:1 con una probabile sottostima dei casi nel sesso maschile per una minore diffusione dello screening e un decorso più spesso asintomatica.



**Figura 13.** Casi di *C. trachomatis* per categoria d'età, dal 2000 al 2009.

L'infezione da *C. trachomatis* è oggi l'infezione sessualmente trasmissibile più comune in Gran Bretagna, con una prevalenza compresa tra il 2 e il 12% tra le donne che frequentano il servizio di Salute pubblica con il picco di incidenza intorno ai 25 anni [13]. L'introduzione nel 2008 di un nuovo sistema di sorveglianza ha permesso di notificare tutti quei casi che fino ad allora erano sconosciuti, comportando un aumento repentino della prevalenza a livello europeo.

Nei Paesi asiatici, la prevalenza varia notevolmente, dal 5,7% in Thailandia, al 17% in India, fino al 26% della Papua Nuova Guinea [267-269]. Anche in America del Sud e nei Caraibi, i dati sono molto variabili, dall'1,9% tra gli adolescenti cileni, al 2,1% delle donne in gravidanza nel Brasile, fino al 12,2% nelle donne che frequentano le cliniche familiari in Giamaica [2, 270, 271].

In Africa, i dati sono relativi soprattutto a studi effettuati sulle donne in gravidanza, con prevalenze che vanno dal 6% in Tanzania al 13% a Capo Verde [2]. La variabilità dei dati però può dipendere anche dalla diversa capacità di rilevare la presenza dell'infezione nella popolazione, data l'assenza prevalente di sintomi e quindi di diagnosi. Secondo i CDC americani, la *C. trachomatis* è l'infezione batterica sessualmente trasmessa più comunemente identificata negli Stati Uniti. Nel 2006, il *Sexually Transmitted Disease Surveillance*, il sistema di sorveglianza statunitense delle malattie sessualmente trasmesse ha riportato oltre 1 milione di casi di infezione nei 50 Stati della Confederazione [8]. Si tratta certamente di un numero sottostimato, dato che molte persone infette non si rivolgono ai servizi sanitari perché non riconoscono i sintomi dell'infezione. I CDC stimano, infatti, in 3 milioni gli americani infettati ogni anno dal batterio.

In media, nei diversi Stati Usa, il 5,6% delle donne tra i 15 e i 24 anni di età, inserite in programmi di screening è risultato positivo ai test [272].

In Italia la malattia non è soggetta a notifica. In uno studio condotto dal 1997 al 2000 su circa 3000 donne di età compresa tra 14-25 anni è stata rilevata una prevalenza di infezione da *C. trachomatis* del 3,5% con un'età mediana degli infetti pari a 22,12 anni [273].

## 1.16 METODI DIAGNOSTICI PER L'IDENTIFICAZIONE DELL'INFEZIONE DA CHLAMYDIA TRACHOMATIS

Una diagnosi rapida e accurata è importante per una gestione ottimale del paziente e per l'interruzione della trasmissione dell'infezione. La possibilità di identificare la presenza di *C. trachomatis* con elevata sensibilità è fondamentale in considerazione del fatto che è proprio la persistenza dell'infezione a determinare e sostenere quelle condizioni cliniche che sono spesso alla base dell'elevata incidenza del contagio.

La *C. trachomatis* viene diagnosticata attraverso un esame di laboratorio che può essere effettuato su due diversi tipi di materiale, un campione prelevato da tessuti infetti, tipicamente il tampone vaginale e/o un campione di urine. Per rispondere alle necessità di una diagnosi rapida e all'esigenza di iniziare rapidamente un trattamento in caso di sospetto clinico, sono stati sviluppati alcuni test rapidi. Oltre al soggetto interessato, è necessario che anche gli eventuali partner sessuali vengano testati per la presenza del batterio.

La diagnosi di infezione da *Chlamydia trachomatis* include diverse tecniche di laboratorio [274]:

- **ESAME COLTURALE:** *C. trachomatis* non cresce nei normali terreni di coltura ma è possibile infettare linee cellulari competenti (HeLa) [275]. Le colture cellulari infettate consentono di individuare anche infezioni a bassa carica batterica grazie a vari sistemi di colorazione che evidenziano i corpi elementari. Per la sua alta specificità (100%) e sensibilità (70-90%) è un metodo che garantisce di evidenziare la presenza o l'assenza dell'infezione.
- **IMMUNOFLUORESCENZA DIRETTA:** è una metodica semplice, rapida e relativamente economica. Ha una sensibilità inferiore all'esame colturale. La sua validità risiede nella sua rapidità di risultato. Nel caso di positività però, data l'incidenza significativa di falsi-positivi, necessita di un altro tipo di test di conferma.

- **TEST IMMUNOENZIMATICI:** è una metodica semplice che si basa sulla presenza degli antigeni (Ag) nel campione esaminato. Può essere utile negli screening, nei quali si richiede di valutare solo la presenza dell'Ag.
- **TEST DI AMPLIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI:** un netto incremento della specificità e soprattutto della sensibilità nella diagnosi di patologie Chlamydia correlate è reso possibile dalla determinazione diretta del DNA di tale patogeno, mediante la tecnica di **PCR** (*Polymerase Chain Reaction*). Per mezzo di tale metodica, infatti, è possibile individuare una specifica regione del genoma di *C. trachomatis* permettendo una diagnosi precisa anche in una tipologia di campione (urina, secreti congiuntivali, liquidi seminali e sinoviali) in cui il patogeno può avere scarsa o nulla vitalità oppure carica microbica molto bassa: infatti, è proprio in questi casi che si determinano le condizioni cliniche sfavorevoli (latenza, asintomaticità e cronicizzazione), che sono alla base dell'elevata incidenza del contagio [276].

Ciascuna di queste tecniche presenta vantaggi e svantaggi in termini di specificità e sensibilità, e questo deve essere tenuto presente nell'interpretazione dei risultati. Uno dei fattori critici è la sensibilità in quanto la possibilità del verificarsi di risultati falsamente negativi permettono alla malattia di diffondersi ulteriormente e di ritardare l'inizio della terapia, rendendo molto più probabili le conseguenti complicazioni.

## **1.17 STRATEGIE DI PREVENZIONE DELL'INFEZIONE DA CHLAMYDIA**

### **TRACHOMATIS**

La prevenzione primaria rappresenta la forma di prevenzione principale. È focalizzata sull'adozione di interventi e comportamenti in grado di evitare o ridurre l'insorgenza e lo sviluppo dell'infezione stessa. La maggior parte delle attività di promozione della salute verso la popolazione mirano a ridurre i fattori di rischio da cui potrebbe derivare un aumento dell'incidenza dell'infezione. Si consiglia quindi di astenersi dall'avere rapporti sessuali a rischio; utilizzare sempre contraccettivi barriera, quali il preservativo che, se anche non eliminano del tutto il rischio di contagio, lo limitano notevolmente; ed infine di prediligere relazioni monogame.

L'introduzione di un programma di screening che vada a riconoscere, nell'ambito di una popolazione asintomatica, quei casi di infezione altrimenti misconosciuti, sembra essere attualmente la strategia migliore per prevenire la diffusione dell'infezione, nonché per instaurare nei casi affetti una terapia mirata che scongiuri l'insorgenza di una complicanza. Oggi grazie all'ottimizzazione delle tecniche diagnostiche sarebbe possibile andare ad identificare anche tutti i casi asintomatici limitando così il numero di possibili conseguenze pericolose, anche se poche Nazioni attualmente riconoscono l'importanza di un'individuazione precoce dell'infezione nella prospettiva di evitare futuri danni cronici e permanenti nella popolazioni suscettibile e nella valutazione dei costi-benefici.

Sebbene le infezioni diagnosticate da *Chlamydia trachomatis* siano trattabili mediante terapia antibiotica, quelle asintomatiche e persistenti rimangono comunque tantissime, per cui sarebbero necessarie strategie preventive che permettano il controllo dell'infezione e la prevenzione delle complicanze nella popolazione.

Nel corso degli anni si sono susseguiti numerosi tentativi allo scopo di sviluppare un vaccino contro la *Chlamydia trachomatis*, ma ad oggi non sono ancora disponibili vaccini per prevenire le infezioni da *Chlamydia* e i migliori candidati sono ancora in fase preclinica. I primi studi si sono focalizzati sull'uso di organismi interi inattivati [277-280], che hanno prodotto una protezione a breve termine in alcuni individui ma hanno anche portato alla manifestazione della malattia in altri, dovuta

all'aumento delle reazioni di ipersensibilità. La maggior parte degli studi si sono focalizzati sulla proteina MOMP come potenziale candidato per il vaccino. Vari esperimenti hanno dimostrato l'importanza di epitopi conformazionali, siti su MOMP, e anticorpi neutralizzanti nel controllo dell'infezione [281]; ma tuttora rimane complicato produrre ricombinanti di MOMP in forma nativa con epitopi intatti e conformazionalmente rilevanti [282].

Poiché la vaccinazione rimane il miglior approccio come forma di protezione nei confronti dell'infezione da Chlamydia, il fine ultimo della ricerca sui vaccini per la Chlamydia è quello di identificare antigeni di protezione capaci di indurre la necessaria risposta immunitaria protettiva.

## **1.18 TERAPIA DELLE INFEZIONI DA *CHLAMYDIA TRACHOMATIS***

L'infezione da *C. trachomatis* è trattabile con antibiotici. Il trattamento di un'infezione genitale non complicata può essere condotto seguendo diversi schemi terapeutici. In generale i farmaci utilizzati per il trattamento sono: azitromicina in dose unica, o doxiciclina a diverso dosaggio di somministrazione per 7 giorni [283]. Essendo trasmissibile per via sessuale, oltre al soggetto interessato, è fondamentale testare ed eventualmente trattare anche tutti i partner sessuali. Infatti il rischio di trasmissione dell'infezione in pazienti esposti a soggetti infetti è molto elevato. La terapia va eseguita:

1. in modo empirico nei pazienti che presentano sintomi o segni riferibili ad infezione da *Chlamydia trachomatis* immediatamente dopo il prelievo diagnostico, senza attendere il risultato del test di laboratorio;
2. nei soggetti asintomatici risultati positivi al test di screening;
3. nei partner sessuali delle persone infette se risultati positivi a loro volta al test diagnostico o considerati tali solo sul dato anamnestico.

Dopo tre settimane dall'inizio della terapia si esegue una valutazione clinica. Se il paziente ha seguito regolarmente la terapia, non persistono sintomi o comunque non si apprezzano dati clinici che possano far sospettare una reinfezione, non è necessario ricorrere a test di controllo. Se invece i sintomi non sono scomparsi oppure si sospetta una reinfezione, occorre ripetere il test diagnostico. Per evitare la possibilità di un risultato falsamente positivo, l'esame dovrà essere effettuato dopo almeno tre settimane dall'inizio della terapia. Nel caso degli adolescenti, considerando l'alto tasso di reinfezione che si riscontra, si consiglia di ripetere un test di screening dopo 3-4 mesi dall'esecuzione della terapia.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Le IST costituiscono uno dei più seri problemi di Sanità Pubblica a livello mondiale, sia nei Paesi industrializzati sia in quelli in via di sviluppo.

Le IST sono considerate infezioni in aumento nella popolazione, in particolare nella fascia d'età adolescente/giovane-adulta; molte di queste, se non trattate, possono portare a serie complicanze per l'apparato genitale sia maschile che femminile. Il fatto che possano spesso decorrere in maniera asintomatica può comportare una diagnosi tardiva di infezione, con limitate possibilità di intervento.

I dati epidemiologici italiani sulle IST sono scarsi e incompleti, soprattutto per alcune di queste e per le fasce d'età più giovani, che costituiscono invece le categorie più a rischio.

Tra i diversi agenti virali, batterici, fungini e protozoari responsabili di IST, Human Papillomavirus (HPV) è riconosciuto come causa necessaria del carcinoma della cervice uterina, mentre *Chlamydia trachomatis* è associata a malattia infiammatoria pelvica e sterilità; le infezioni sostenute da tali patogeni sono le più diffuse nella popolazione generale.

Il presente lavoro di tesi ha pertanto preso in considerazione queste due IST ed è stato condotto impiegando metodi bio-molecolari e bio-informatici per il raggiungimento dei seguenti obiettivi:

1. Epidemiologia molecolare delle infezioni da HPV e *Chlamydia trachomatis*.

A tale scopo si è provveduto a:

- studiare la prevalenza di infezione da HPV e caratterizzare i principali genotipi infettanti in donne della popolazione generale femminile (25-64 anni), fascia d'età normalmente afferente ai programmi di screening;
- indagare la frequenza di infezione da HPV e caratterizzare i principali genotipi circolanti in adolescenti/giovani donne (13-24 anni) sessualmente attive;
- valutare l'eventuale presenza di infezioni da HPV e dei genotipi infettanti in adolescenti/giovani donne sessualmente attive vaccinate con vaccino anti-HPV;
- studiare la prevalenza di infezione da *Chlamydia trachomatis* nelle adolescenti/giovani donne (13-24 anni) sessualmente

attive; in questo lavoro è stata prioritariamente scelta questa fascia d'età dal momento che i dati disponibili a livello nazionale risultano esigui.

2. Sorveglianza microbiologica delle infezioni sostenute da HPV e *Chlamydia trachomatis* mediante analisi filogenetica.

A tale scopo si è provveduto a:

- studiare le varianti geografiche e gli eventuali "escape mutants" dei genotipi ad alto rischio oncogeno HPV-16 e HPV-18;
- valutare i principali serovar di *Chlamydia trachomatis* responsabili di infezione nelle adolescenti/giovani donne sessualmente attive.

3. Valutazione delle co-infezioni HPV/*Chlamydia trachomatis* nelle adolescenti/giovani donne sessualmente attive, considerandone gli aspetti epidemiologici in relazione a potenziali strategie preventive.

### **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1 POPOLAZIONE IN STUDIO**

In questo lavoro di tesi sono stati inclusi 1557 campioni biologici appartenenti ad altrettanti soggetti di sesso femminile, raccolti e successivamente analizzati nel periodo compreso tra gennaio 2009 e dicembre 2011.

I campioni in studio appartenevano a 3 diversi gruppi di soggetti:

- 688 brush cervicali, raccolti da donne di età compresa tra 25 e 64 anni (età mediana: 36 anni);
- 563 brush cervicali, raccolti da adolescenti/giovani donne di età compresa tra 13 e 24 anni (età mediana: 19 anni) sessualmente attive;
- 306 brush cervicali, raccolti da giovani donne (età mediana 19 anni, range 19-21 anni), sessualmente attive, sottoposte a vaccinazione volontaria nel 18° anno d'età, con vaccino tetravalente anti-HPV.

I brush cervicali sono stati raccolti, per le prime due coorti in studio, da donne appartenenti alla popolazione generale, afferenti presso consultori, ambulatori clinici e centri giovani delle ASL dei Comuni di Milano, Genova e Torino per visite ginecologiche di screening e/o di controllo. Ad ogni soggetto, se maggiorenne, o al tutore legale, se minorenni, è stata richiesta l'autorizzazione all'utilizzo dei dati in forma anonima tramite consenso informato.

Nella coorte delle vaccinate, sono stati inclusi soggetti arruolati nel corso di uno studio condotto presso l'Istituto Europeo di Oncologia (IEO) di Milano. I campioni citologici sono stati raccolti dopo almeno un anno dal completamento della scheda vaccinale.

Lo studio è stato condotto nell'ambito di due Progetti di Ricerca Nazionale (PRIN 2007 e PRIN 2009) che hanno coinvolto il Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia dell'Università degli Studi di Milano, il Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova e il Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, Università degli Studi di Torino.

Tutti i campioni raccolti sono stati sottoposti alle opportune analisi per determinare la presenza di infezione da HPV e dei genotipi di HPV infettanti mediante metodi molecolari.

I campioni riscontrati infetti da genotipo HPV-16 o genotipo HPV-18 sono stati quindi sottoposti ad ulteriori indagini filogenetico-molecolari per lo studio delle varianti geografiche di tali genotipi e la caratterizzazione di eventuali varianti "escape".

I campioni raccolti dalle adolescenti/giovani donne di età 13-24 anni sono stati inoltre sottoposti a specifiche analisi per determinare, mediante metodi molecolari, la presenza di infezione da *Chlamydia trachomatis*. I campioni risultati infetti da tale agente patogeno sono stati analizzati filogeneticamente per valutare i serovar circolanti.

## **3.2 RACCOLTA, CONSERVAZIONE ED ESTRAZIONE DI DNA DA CAMPIONI**

### **BIOLOGICI**

Da ciascuna donna appartenente alle diverse popolazioni in studio sono state prelevate cellule dell'epitelio della cervice uterina tramite brush cervicale, nel corso della visita ginecologica. Le cellule sono state poi risospese nel terreno liquido *ThinPrep PreservCyt Solution®* e conservate a 4°C fino al momento dell'indagine molecolare, svolta presso la Sezione di Virologia applicata alla Sanità Pubblica, Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia, Università degli Studi di Milano.

#### **• PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

Dieci ml di soluzione *PreservCyt®* contenente il materiale citologico, sono stati centrifugati a 4500xg per 15 minuti a 4°C, il pellet di cellule così ottenuto è stato risospeso in 1 ml di PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) e conservato a -20°C fino alla successiva fase operativa.

#### **• ESTRAZIONE DEL DNA**

L'estrazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di un estrattore automatico (*NucliSENS® EasyMAG®*, Biomérieux, France) per l'estrazione contemporanea sia dell'RNA che del DNA contenuti nel campione.

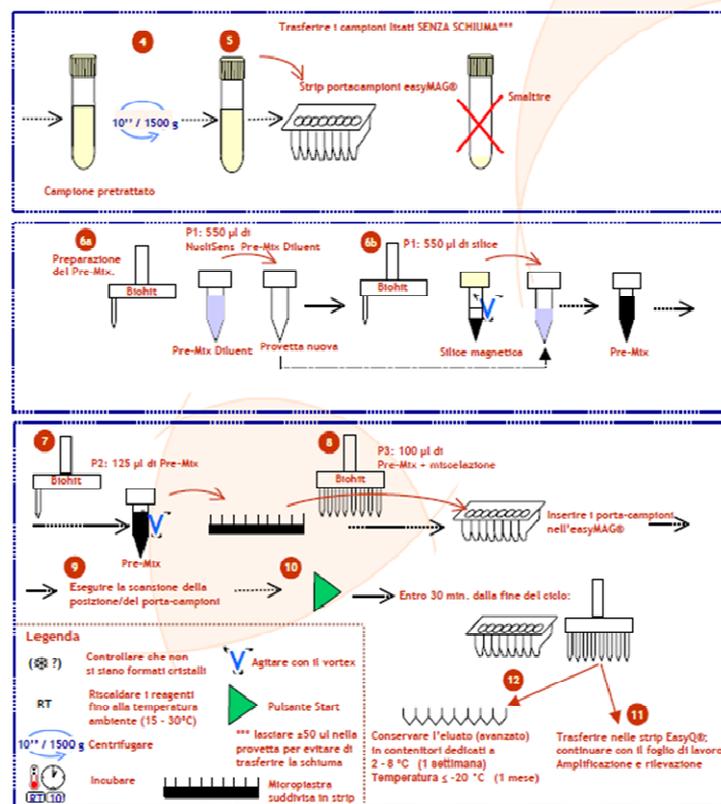
Questo metodo, basato sulla chimica di Boom, utilizza la silice magnetica per estrarre gli acidi nucleici dal campione di partenza. In ambiente con forti concentrazioni di sali, gli acidi nucleici legano le particelle di silice costituendo la fase solida di estrazione. Attraverso cicli di lavaggi i componenti diversi dagli acidi nucleici vengono eliminati e al termine dell'estrazione gli acidi nucleici vengono eluiti dalla fase solida.

Il protocollo si articolava in quattro diverse fasi (Figura 14).

1. **Lisi dell'involucro virale** con la conseguente liberazione degli acidi nucleici contenuti e inattivazione di RNasi e DNasi: 500 µl di campione sono stati aggiunti a 1,5 ml di NucliSens Lysis Buffer, una soluzione contenente prevalentemente tiocianato di guanidina ad una concentrazione di 5 mol/l. Successivamente la miscela è stata incubata per 10 minuti a temperatura ambiente.

2. **Legame alla silice:** 100  $\mu$ l di silice costituita da biglie magnetiche sono stati aggiunti a ciascun campione lisato.
3. **Lavaggi:** la fase prevedeva 4 lavaggi utilizzando tre diversi buffer a composizione non nota.
4. **Eluizione:** dopo 5 minuti di incubazione a 60°C in un volume di 100  $\mu$ l di buffer di eluizione (a composizione non nota), viene eliminata la silice magnetica e l'acido nucleico rimasto nel buffer di eluizione veniva trasferito in provette da 1,7 ml per lo stoccaggio.

Terminata l'estrazione, l'acido nucleico ottenuto è stato utilizzato direttamente per le analisi molecolari e successivamente conservato a -20°C.



**Figura 14:** Descrizione delle procedure del metodo d'estrazione NucliSENS® EasyMAG®, Biomérieux, The Netherlands (biomerieux-usa.com).

Tranne la prima fase, eseguita manualmente e in ambiente protetto (cappa a flusso laminare di classe II), l'ultima fase di trasferimento dell'acido nucleico eluito, le restanti fasi sono state eseguite in modo automatizzato dallo strumento.

- **MISURAZIONE DEL DNA ESTRATTO**

La concentrazione ed il grado di purezza del DNA estratto sono stati valutati mediante analisi spettrofotometrica (*NanoDrop ND-2000/220C*, Euroclone® Thermo Scientific, USA) misurando l'assorbanza degli estratti alla lunghezza d'onda di 260 nm (assorbanza del DNA) e di 280 nm (assorbanza delle proteine). Un rapporto tra assorbanza misurata a 260 e quella a 280 ( $A_{260}/A_{280}$ ) compreso tra 1,8 e 2,0 è stato considerato un buon indice di purezza dell'acido nucleico estratto, sufficientemente privo di contaminanti proteici.

- **VERIFICA DELL'INTEGRITÀ E DELLA COMPETENZA DEL DNA ESTRATTO MEDIANTE SAGGIO DI PCR**

Per verificare l'integrità e la competenza del DNA estratto è stato amplificato un frammento di 268 bp del gene umano ubiquitario della  $\beta$ -globina (sito sul cromosoma XI) utilizzando la coppia di primer GH<sub>2</sub>O e PCO<sub>4</sub> [284].

**GH<sub>2</sub>O** . 5'- CAA CTT CAT CCA CgT TCA CC - 3',  
primer sense, temperatura di melting ( $T^om$ ) 62°C.

**PCO<sub>4</sub>** . 5'- gAA gAg CCA Agg ACA ggT AC - 3',  
primer anti-sense,  $T^om$  60°C.

In una miscela di reazione del volume finale di 25  $\mu$ l vengono aggiunti: 0,5  $\mu$ g di DNA estratto, 5  $\mu$ l di *5x Green GoTaq® Reaction Buffer* (7,5mM MgCl<sub>2</sub>; Ph 8,5), 0,5  $\mu$ l di dNTPs (10 mM), 0,5  $\mu$ l di ciascun primer (30 pmoli/ $\mu$ l), 0,125  $\mu$ l di Taq (5 U/ $\mu$ l) (*GoTaq® DNA polymerase, Promega*) e H<sub>2</sub>O per biologia molecolare (Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, Italia) fino al volume finale.

La reazione di amplificazione genica (PCR) è stata eseguita utilizzando un termociclatore (*Thermal cycler, Perkin Elmer 9700, USA*) alle seguenti condizioni:

N°CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94°C x 5'		
25	94°C x 30''	55°C x 30''	72°C x 30''
1			72°C x 7'

### 3.3 DIAGNOSI DI INFEZIONE DA HPV E TIPIZZAZIONE VIRALE

- **AMPLIFICAZIONE DEL DNA VIRALE MEDIANTE SAGGIO DI PCR SPECIFICO PER LA ORF L1 DI HPV**

Per la determinazione del DNA virale è stato amplificato un frammento dell'ORF L1 di circa 450 pb (variabile di pochi nucleotidi in eccesso o difetto secondo il tipo di HPV) mediante un saggio di PCR *in house*. È stata utilizzata la coppia di primer **ELSI\_F** ed **ELSI\_R**:

**ELSI\_F** 5' - gCN CAR ggH CAT AAY AAT gg - 3' [\*]

nt 6582-nt 6601, sulla sequenza di riferimento HPV-16 Europea AF536179, primer sense,  $T^{\circ}m$  50,8 °C.

**ELSI\_R** 5' - CgN CCH AAD ggA AAY TgA TC - 3' [\*]

nt 7014-nt 7033, sulla sequenza di riferimento HPV-16 Europea AF536179, primer anti-sense,  $T^{\circ}m$  58,5°C.

[\* N = A o C o G o T; R = A o G; H = A o C o T; Y = C o T]

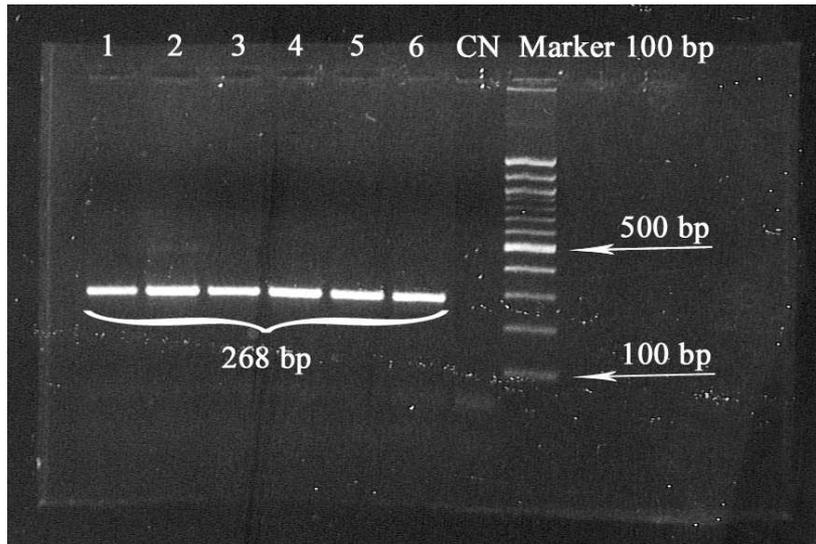
In una miscela di reazione con un volume finale di 50 µl vengono aggiunti: 1 µg di DNA estratto, 10 µl di *5x Green GoTaq® Reaction Buffer* (7,5mM MgCl<sub>2</sub>; Ph 8,5), 1 µl di dNTPs (10 mM), 1 µl di ciascun primer (30 pmoli/µl), 0,25 µl di Taq (5 U/µl) (*GoTaq® DNA polymerase, Promega*) e H<sub>2</sub>O per biologia molecolare (*Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, Italia*) fino al volume finale.

La reazione di amplificazione genica (PCR) è stata eseguita utilizzando un termociclatore (*Thermal cycler, Perkin Elmer 9700, USA*) alle seguenti condizioni:

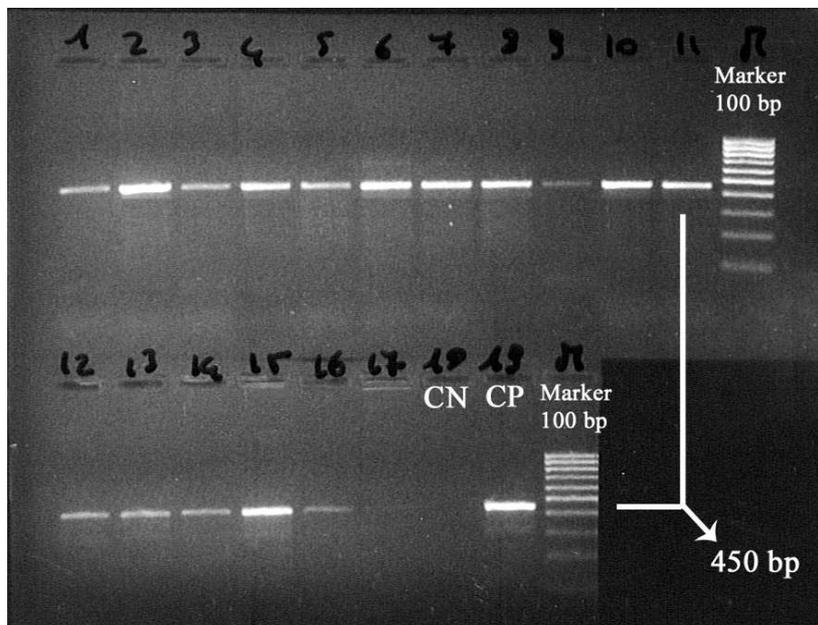
N°CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94°C x 5'		
40	94°C x 30''	55°C x 30''	72°C x 30''
1			72°C x 7'

• **VISUALIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR**

I prodotti di amplificazione sono stati evidenziati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente 0,01 µg/ml di etidio bromuro. La corsa elettroforetica è stata eseguita ad un voltaggio di 120 mV per 60 minuti. L'amplificato d'interesse è stato riconosciuto mediante confronto con un opportuno marker di riferimento (*PCR 100 bp Low Ladder*, BioLabs, New England) (Figure 15 e 16).



**Figura 15:** Elettroforesi su gel di agarosio al 2% di una PCR per la  $\beta$ -globina.



**Figura 16:** Elettroforesi su gel di agarosio al 2% di una PCR per l'amplificazione di un frammento di 450 bp dell'ORF L1.

• **GENOTIPIZZAZIONE DI HPV MEDIANTE RFLP**

I campioni risultati HPV-DNA positivi sono stati tipizzati tramite la tecnica enzimatica "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP). Previa purificazione dei prodotti di amplificazione in regione L1 (primer ELSI\_R/ELSI\_F), la genotipizzazione è stata effettuata tramite digestione enzimatica mediante tre enzimi di restrizione: *RsaI*, *HaeIII* e *DdeI* (*Recombinant Enzyme, BioLabs, New England*) [285].

**DIGESTIONE ENZIMATICA MEDIANTE L'UTILIZZO DEGLI ENZIMI *RSA I*, *HAE III* E *DDE I***

Per ognuno dei 3 enzimi è stata preparata una miscela di digestione del volume finale di 15 µl costituita da: 10 µl di amplificato (regione L1 del genoma virale), 0,1 µl di enzima (10 U/ml), 2,5 µl di *Buffer NE* 10x (specifico per ogni enzima) e 2,4 µl di H<sub>2</sub>O sterile per biologia molecolare (Tabella 5). La soluzione di reazione è stata quindi incubata a 37°C per 60 minuti; successivamente gli enzimi sono stati inattivati a 80°C per 20 minuti.

	Miscela 1	Miscela 2	Miscela 3
<b>Enzima</b>	<i>Rsa I</i> -0.1 µl	<i>Hae III</i> -0.1 µl	<i>Dde I</i> -0.1 µl
<b>Buffer</b>	<i>NE 1</i> -2.5 µl	<i>NE 2</i> -2.5 µl	<i>NE 3</i> -2.5 µl
<b>Amplificato</b>	10 µl	10 µl	10 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2.4 µl	2.4 µl	2.4 µl
<b>Totale</b>	15 µl	15 µl	15 µl

**Tabella 5:** Miscela di digestione.

I siti di taglio degli enzimi di restrizione sono i seguenti:

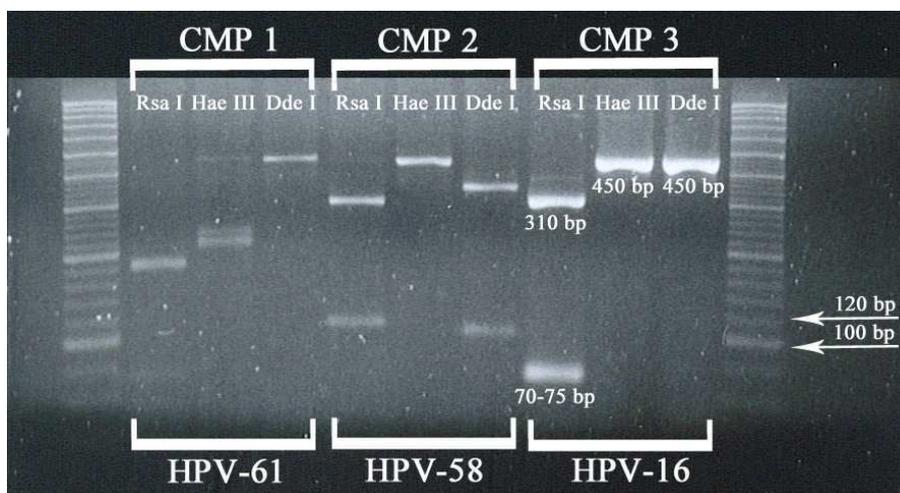
*Rsa I*      5'...GT▼AC...3'  
               3'...CA▲TG...5'

*Hae III*    5'...GG▼CC...3'  
               3'...CC▲GG...5'

*Dde I*      5'...C▼TNA G...3'  
               3'...G ANT▲C...5'

## VISUALIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI DIGESTIONE

I prodotti di digestione sono stati identificati mediante separazione in gel di agarosio al 3% contenente 0,01 µg/ml di etidio bromuro. L'elettroforesi è stata condotta ad un voltaggio di 100 mV per 90 minuti. I pesi molecolari dei frammenti di digestione sono stati riconosciuti mediante confronto con due opportuni marker di riferimento (*PCR 100 bp Low Ladder, SIGMA* e *PCR 20 bp ladder without reference bands, SIGMA*). Il genotipo virale d'interesse è stato riconosciuto tramite la lettura combinata dei pesi molecolari dei frammenti ottenuti dalle tre digestioni con gli enzimi *RsaI*, *HaeIII* e *DdeI*. Un esempio di tipizzazione di tre diversi campioni è mostrato in Figura 17; mentre in Tabella 6 è riportato lo schema di lettura dei tagli per l'individuazione dei diversi genotipi.



**Figura 17:** Immagine di un'elettroforesi su gel di agarosio al 3% in cui sono visibili i prodotti di digestione di una RFLP.

<b>Rischio</b>	<b>Tipo</b>	<b>Rsa I (bp)</b>	<b>Hae III (bp)</b>	<b>Dde I (bp)</b>
HR-Gruppo 1	16	310 72 70	<b>444 8</b>	<b>INDIGERITO (452)</b>
HR-Gruppo 1	18	135 125 85 72 38	<b>INDIGERITO (455)</b>	432 23
HR-Gruppo 1	31	380 72	328 124	283 167 2
HR-Gruppo 1	33	236 102 72 39	<b>INDIGERITO (449)</b>	320 77 52
HR-Gruppo 1	35	177 161 72 42	261 180 83	294 135 23
HR-Gruppo 1	39	260 123 72	<b>INDIGERITO (455)</b>	324 131
HR-Gruppo 1	45	338 72 45	<b>447 8</b>	324 131
HR-Gruppo 1	51	380 72	379 73	362 90
HR-Gruppo 1	52	<b>INDIGERITO (449)</b>	258 183 8	357 92
HR-Gruppo 1	56	310 72 49 18	275 166	307 142
HR-Gruppo 1	58	306 111 32	<b>INDIGERITO (449)</b>	348 101
HR-Gruppo 1	59	<b>INDIGERITO (452)</b>	396 56	<b>INDIGERITO (452)</b>
HR-Gruppo 2A	68	260 85 72 38	<b>INDIGERITO (455)</b>	<b>INDIGERITO (455)</b>
HR-Gruppo 2B	26	365 72 18	<b>INDIGERITO (455)</b>	<b>INDIGERITO (455)</b>
HR-Gruppo 2B	30	<b>INDIGERITO (450)</b>	232 217	291 158
HR-Gruppo 2B	34	186 161 96 15	334 124	211 151 88 8
HR-Gruppo 2B	53	<b>INDIGERITO (449)</b>	232 217	206 158 85
HR-Gruppo 2B	66	<b>INDIGERITO (449)</b>	<b>INDIGERITO (449)</b>	291 158
HR-Gruppo 2B	67	310 72 67	266 183	299 92 50 8
HR-Gruppo 2B	69	365 72 18	223 183 49	<b>INDIGERITO (455)</b>
HR-Gruppo 2B	70	231 123 72 29	232 117 106	<b>INDIGERITO (450)</b>
HR-Gruppo 2B	73	201 161 96	<b>INDIGERITO (449)</b>	243 215
HR-Gruppo 2B	82	383 72	<b>INDIGERITO (455)</b>	288 167
HR-Gruppo 2B	85	410 45	<b>INDIGERITO (455)</b>	270 185
LR-Gruppo 3	6	161 149 72 67	217 124 108	382 67
LR-Gruppo 3	11	216 135 72 26	217 124 108	<b>447 2</b>
LR-Gruppo 3	28	268 72 45 43	397 31	<b>426 2</b>
LR-Gruppo 3	32	216 161 72	317 124 8	320 108 21
LR-Gruppo 3	40	365 90	<b>447 8</b>	297 158
LR-Gruppo 3	42	242 135 72	<b>INDIGERITO (449)</b>	341 108
LR-Gruppo 3	43	339 71 45	330 125	<b>INDIGERITO (455)</b>
LR-Gruppo 3	44	22 161 72	223 124 108	297 112 46
LR-Gruppo 3	54	138 125 117 72	217 127 108	<b>INDIGERITO (452)</b>
LR-Gruppo 3	55	165 161 72 57	215 124 108 8	112 111 101 85 46
LR-Gruppo 3	57	<b>INDIGERITO (449)</b>	<b>INDIGERITO (449)</b>	211 142 50 46
LR-Gruppo 3	61	185 180 72 18	212 211 24 8	<b>INDIGERITO (455)</b>
LR-Gruppo 3	62	359 72 18	232 217	<b>INDIGERITO (449)</b>
LR-Gruppo 3	71	380 72	217 127 108	320 132
LR-Gruppo 3	72	365 72 18	220 211 24	300 155
LR-Gruppo 3	74	165 161 72 60	218 183 49 8	215 129 114
LR-Gruppo 3	81	<b>INDIGERITO (452)</b>	127 113 108 96 8	<b>INDIGERITO (452)</b>
LR-Gruppo 3	83	380 72	383 69	<b>INDIGERITO (452)</b>
LR-Gruppo 3	84	310 142	346 106	220 142 90
LR-Gruppo 3	86	380 72	343 106 3	310 125 17
LR-Gruppo 3	87	380 72	232 209 8 3	362 90
LR-Gruppo 3	89	380 72	317 127 8	246 152 54

**Tabella 6.** Pattern di digestione del frammento di 450 bp del gene L1 con gli enzimi di restrizione RsaI, HaeIII e DdeI per l'identificazione dei diversi genotipi di HPV.

### 3.4 DIAGNOSI DI INFEZIONE DA *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

- **AMPLIFICAZIONE DEL DNA PLASMIDICO MEDIANTE SAGGIO DI NESTED-PCR SPECIFICO PER IL PLASMIDE CRIPTICO DI *CHLAMYDIA TRACHOMATIS***

La determinazione del DNA batterico per la diagnosi dell'infezione da *C. trachomatis* è stata eseguita mediante l'amplificazione di un frammento del plasmide criptico costitutivamente presente nel battere attraverso un saggio di *nested-PCR* [286].

#### **PRIMO STEP**

Il primo step amplificava un segmento di 212 pb tramite l'utilizzo della coppia di primer **CLA-1F** e **CLA-1R**:

**CLA-1F** 5'- TTg gCY gCT AgA AAA ggC gAT T -3' [\*]

nt 7153-nt 7174 sul plasmide criptico, primer sense,  $T^{\circ}m$  69,8°C.

**CLA-1R** 5'- TCC ggA ACA YAT gAT gCg AAg T -3'[\*]

nt 7365 - nt 7386 sul plasmide criptico, primer anti-sense,  $T^{\circ}m$  67,4°C.

[\* Y = C o T]

In una miscela di reazione con un volume finale di 50  $\mu$ l sono stati aggiunti: 0,5  $\mu$ g di DNA estratto, 10  $\mu$ l di 5x *Green GoTaq® Reaction Buffer* (7,5mM MgCl<sub>2</sub>; Ph 8,5), 1  $\mu$ l di dNTPs (10 mM), 1  $\mu$ l di ciascun primer (25 pmoli/ $\mu$ l), 0,25  $\mu$ l di Taq (5 U/ $\mu$ l) (*GoTaq® DNA polymerase, Promega*) e H<sub>2</sub>O per biologia molecolare (*Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, Italia*) fino al volume finale.

La reazione di amplificazione genica (PCR) è stata eseguita utilizzando un termociclatore (*Thermal cycler, Perkin Elmer 9700, USA*) alle seguenti condizioni:

N°CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94°C x 5'		
30	94°C x 30''	50°C x 30''	72°C x 30''
			72°C x 7'

## SECONDO STEP

Nel secondo step è stato amplificato un frammento di 150 pb, interno al segmento amplificato durante il primo step, utilizzando la coppia di primer **CLA-2F** e **CLA-2R**:

**CLA-2F** 5'- AAC CAA ggT CgA TgT gAT Ag -3'

nt 7179-nt 7198 sul plasmide criptico, primer sense,  $T^{\circ}m$  59°C.

**CLA-2R** 5'- TCA gAT AAT Tgg CgA TTC TT -3'.

nt 7328-nt 7347 sul plasmide criptico, primer anti-sense,  $T^{\circ}m$  58,8°C.

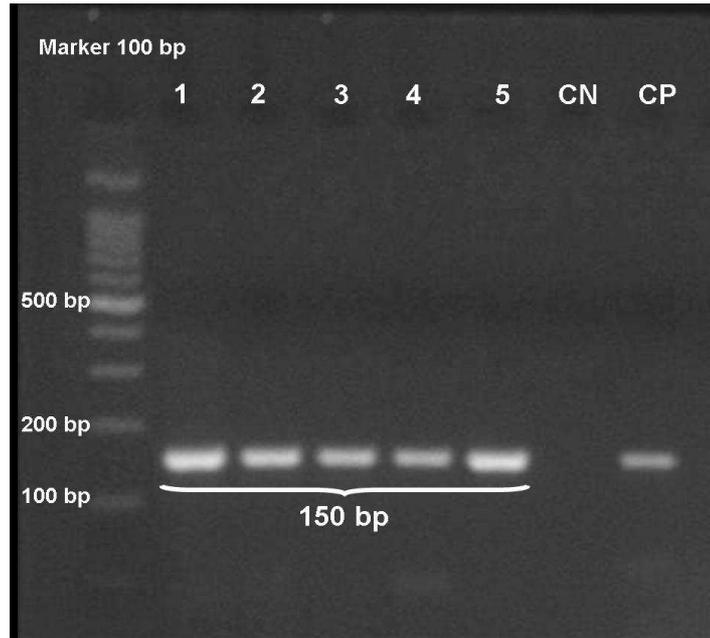
In una miscela di reazione con un volume finale di 50  $\mu$ l sono stati aggiunti: 2  $\mu$ l di amplificato dal primo step, 10  $\mu$ l di 5x *Green GoTaq® Reaction Buffer* (7,5mM MgCl<sub>2</sub>; Ph 8,5), 1  $\mu$ l di dNTPs (10 mM), 1  $\mu$ l di ciascun primer (25 pmoli/ $\mu$ l), 0,25  $\mu$ l di Taq (5 U/ $\mu$ l) (*GoTaq® DNA polymerase, Promega*) e H<sub>2</sub>O per biologia molecolare (*Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, Italia*) fino al volume finale.

La reazione di amplificazione genica (PCR) è stata eseguita utilizzando un termociclatore (*Thermal cycler, Perkin Elmer 9700, USA*) alle seguenti condizioni:

N°CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94°C x 5'		
25	94°C x 30''	50°C x 30''	72°C x 30''
1			72°C x 7'

### • VISUALIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR

I prodotti di amplificazione sono stati evidenziati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente 0,01  $\mu$ g/ml di etidio bromuro. La corsa elettroforetica è stata eseguita ad un voltaggio di 120 mV per 60 minuti. L'amplificato d'interesse è stato riconosciuto mediante confronto con un opportuno marker di riferimento (*PCR 100 bp Low Ladder, BioLabs, New England*) (Figura 18).



**Figura 18:** Elettroforesi su gel di agarosio al 2% di una PCR per l'amplificazione di un frammento di 150 bp del DNA plasmidico.

### 3.5. STUDIO DELLE VARIANTI GEOGRAFICHE IN LCR E DEGLI ESCAPE MUTANTS IN L1 DI HPV-16 E HPV-18

- **AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR DI UN FRAMMENTO DELLA REGIONE REGOLATORIA LCR DI HPV-16 E DI HPV-18**

I campioni risultati HPV-16 e HPV-18 positivi sono stati sottoposti ad un saggio di PCR specifico per la regione regolatoria LCR del genotipo 16 e del genotipo 18; è stato quindi amplificato un segmento di circa 730 bp (nt 7289-nt 93) con la coppia di primer **LCR-s** e **LCR-as** per HPV-16 e un segmento di 1169 pb (nt 7120-nt 432) con la coppia di primer **LCR\_HP-18\_F** e **LCR\_HP-18\_R** per HPV-18 [182, 287]. I due saggi molecolari di amplificazione sono stati condotti separatamente.

#### HPV-16

**LCR-s** 5' - gCT TgT gTA ACT ATT gTg TCA - 3'

nt 7289-nt 7309 sulla sequenza di riferimento HPV-16 Europea AF536179, primer sense,  $T^{\circ}m$  56°C.

**LCR-as** 5' - gTC CAg AAA CAT TgC AgT TCT - 3'

nt 94-nt 115 sulla sequenza di riferimento HPV-16 Europea AF536179, primer anti-sense,  $T^{\circ}m$  60°C.

#### HPV-18

**LCR\_HP-18\_F** 5' - TAC gTg CCA ggA AgT AAT ATg T - 3'

nt 7120-nt 7141 sulla sequenza di riferimento HPV-18 Europea X05015, primer sense,  $T^{\circ}m$  59,9°C.

**LCR\_HP-18\_R** 5' - Agg TgC CTg Cgg TgC CAg A - 3'

nt 414-nt 432 sulla sequenza di riferimento HPV-18 Europea X05015, primer anti-sense,  $T^{\circ}m$  73,9°C.

Per ciascun saggio di PCR, in una miscela di reazione con un volume finale di 50 µl vengono aggiunti: 1 µg di DNA estratto, 10 µl di 5x Green

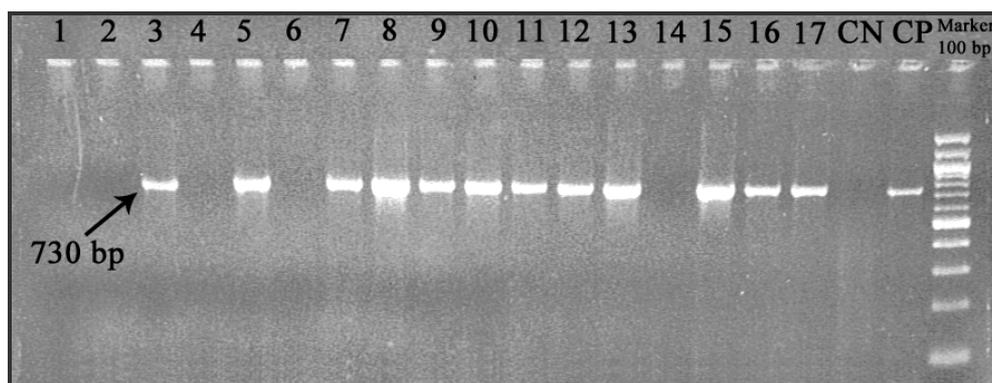
*GoTaq® Reaction Buffer* (7,5mM MgCl<sub>2</sub>; Ph 8,5), 1 µl di dNTPs (10 mM), 1 µl di ciascun primer (30 pmoli/µl), 0,25 µl di Taq (5 U/µl) (*GoTaq® DNA polymerase, Promega*) e H<sub>2</sub>O per biologia molecolare (*Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, Italia*) fino al volume finale.

Le PCR sono state condotte utilizzando un termociclatore (*Thermal cycler, Perkin Elmer 9700, USA*) alle seguenti condizioni:

N° CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94°C x 5'		
40	94°C x 30''	55°C x 30''	72°C x 1'
1			72°C x 7'

I prodotti di amplificazione sono stati evidenziati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente 0,01 µg/ml di etidio bromuro.

La corsa elettroforetica è stata condotta ad un voltaggio di 120 mV per 60 minuti. L'amplificato d'interesse è stato riconosciuto mediante confronto con un opportuno marker di riferimento (*PCR 100 bp Low Ladder, BioLabs, New England*) (Figura 19).



**Figura 19:** Immagine di un'elettroforesi su gel di agarosio al 2% in cui sono visibili frammenti di 730 bp della regione regolatoria LCR del genoma di HPV-16.

• **AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR DI DUE FRAMMENTI DELL'ORF L1 DI HPV-16**

I campioni HPV-16 positivi sono stati sottoposti ad un protocollo che prevede due saggi distinti di PCR per l'amplificazione di altrettanti frammenti, parzialmente sovrapposti, rispettivamente di 911 bp e 879 bp dell'ORF L1 di HPV-16 [288].

Per l'amplificazione del frammento di 911 bp (nt 5637-nt 6547) del gene L1 di HPV-16 è stato allestito un saggio di PCR utilizzando la seguente coppia di primer **L1F** e **L1Rnest**:

**L1F** 5' - **ATg TCT CTT Tgg CTg CCT Ag** - 3'

nt 5637-nt 5656 sulla sequenza di riferimento HPV-16 Europea AF536179, primer anti-sense,  $T^{\circ}m$  60°C.

**L1Rnest** 5' - **gCA TCA gAg gTA ACC ATA gAA C** - 3'

nt 6525-nt 6547 sulla sequenza di riferimento HPV-16 Europea AF536179, primer anti-sense,  $T^{\circ}m$  48°C.

In una miscela di reazione con un volume finale di 50  $\mu$ l sono stati aggiunti: 5  $\mu$ l di DNA estratto, 10  $\mu$ l di *5x Green GoTaq® Reaction Buffer* (7,5mM MgCl<sub>2</sub>; Ph 8,5), 1  $\mu$ l di dNTPs (10 mM), 1  $\mu$ l di ciascun primer (30 pmoli/ $\mu$ l), 0,25  $\mu$ l di Taq (5 U/ $\mu$ l) (*GoTaq® DNA polymerase, Promega*) e H<sub>2</sub>O per biologia molecolare (*Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, Italia*) fino al volume finale.

La PCR è stata condotta utilizzando un termociclatore (*Thermal cycler, Perkin Elmer 9700, USA*) alle seguenti condizioni:

N°CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94°C x 5'		
40	94°C x 1'	55°C x 1'	72°C x 1'
1			72°C x 7'

L'amplificazione del secondo frammento di 879 bp (nt 6256-nt 7134) del gene L1 di HPV-16 è stata ottenuta utilizzando la coppia di primer **L1Fnest** e **L1R**:

**L1Fnest** 5' - CTA Tgg ACT TTA CTA CAT TAC Agg CTA- 3'

nt 6256-nt 6282 sulla sequenza di riferimento HPV-16 Europea AF536179, primer anti-sense,  $T^{\circ}m$  50°C.

**L1R** 5' - gTT TAg CAg TTg TAg Agg TAg Atg A - 3'

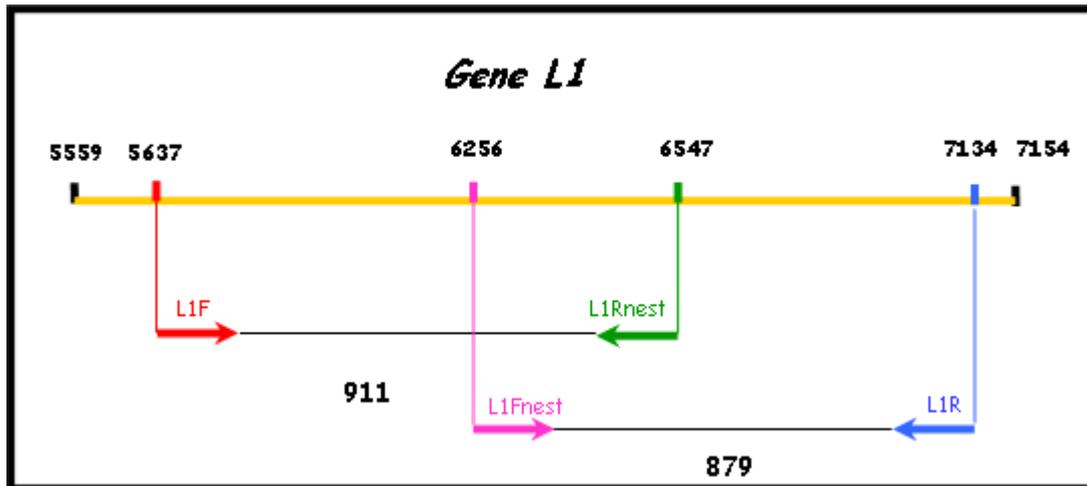
nt 7110-nt 7134 sulla sequenza di riferimento HPV-16 Europea AF536179, primer anti-sense,  $T^{\circ}m$  49°C.

In una miscela di reazione con un volume finale di 50  $\mu$ l sono stati aggiunti: 5  $\mu$ l di DNA estratto, 10  $\mu$ l di *5x Green GoTaq® Reaction Buffer* (7,5mM MgCl<sub>2</sub>; Ph 8,5), 1  $\mu$ l di dNTPs (10 mM), 1  $\mu$ l di ciascun primer (30 pmoli/ $\mu$ l), 0,25  $\mu$ l di Taq (5 U/ $\mu$ l) (*GoTaq® DNA polymerase, Promega*) e H<sub>2</sub>O per biologia molecolare (*Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, Italia*) fino al volume finale.

La PCR è stata condotta utilizzando un termociclatore (*Thermal cycler, Perkin Elmer 9700, USA*) alle seguenti condizioni:

N°CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94°C x 5'		
40	94°C x 1'	55°C x 1'	72°C x 1'
1			72°C x 7'

Nella Figura 20 è schematizzato il gene L1 ed i prodotti d'amplificazione ottenuti con le coppie di primer L1F/L1Rnest e L1Fnest/L1R. I frammenti genici ottenuti dalle due reazioni sono stati quindi sottoposti a sequenziamento. La sovrapposizione delle loro sequenze ha permesso di analizzare l'intero gene L1 (1498 pb). L'analisi delle sequenze ha così consentito l'individuazione di eventuali varianti geniche di HPV-16 L1.



**Figura 20:** Schema del gene L1 e dei prodotti di PCR per HPV-16.

I prodotti di amplificazione sono stati evidenziati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente 0,01 µg/ml di etidio bromuro.

La corsa elettroforetica è stata condotta ad un voltaggio di 120 mV per 60 minuti. Gli amplificati d'interesse sono stati riconosciuti mediante confronto con un opportuno marker di riferimento (*PCR 100 bp Low Ladder, BioLabs, New England*).

• **AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR DI DUE FRAMMENTI DELL'ORF L1 DI HPV-18**

I campioni HPV-18 positivi sono stati sottoposti ad un protocollo che prevede due saggi distinti di PCR per l'amplificazione di altrettanti frammenti, parzialmente sovrapposti, rispettivamente di 911 pb e 870 pb dell'ORF L1 di HPV-18 [288].

Per l'amplificazione del frammento di 911 bp (nt 5613-nt 6523) del gene L1 di HPV-18 è stato allestito un saggio di PCR utilizzando la seguente coppia di primer **L1\_18\_1F** e **L1\_18\_1R**:

**L1\_18\_1F** 5' - ATg gCT WTg Tgg Cgg CCT Ag - 3' [\*]

nt 5613-nt 5632 sulla sequenza di riferimento HPV-18 Europea X05015, primer anti-sense,  $T^om$  60°C.

[\* W = A o T]

**L1\_18\_1R** 5' - gAg TCA gAg gTA ACA ATA gAg C - 3'

nt 6502-nt 6523 sulla sequenza di riferimento HPV-18 Europea X05015, primer anti-sense,  $T^om$  48°C.

In una miscela di reazione con un volume finale di 50 µl sono stati aggiunti: 5 µl di DNA estratto, 10 µl di *5x Green GoTaq® Reaction Buffer* (7,5mM MgCl<sub>2</sub>; Ph 8,5), 1 µl di dNTPs (10 mM), 1 µl di ciascun primer (30 pmoli/µl), 0,25 µl di Taq (5 U/µl) (*GoTaq® DNA polymerase, Promega*) e H<sub>2</sub>O per biologia molecolare (*Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, Italia*) fino al volume finale.

La PCR è stata condotta utilizzando un termociclatore (*Thermal cycler, Perkin Elmer 9700, USA*) alle seguenti condizioni:

N°CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94°C x 5'		
40	94°C x 1'	60°C x 1'	72°C x 1'
1			72°C x 7'

L'amplificazione del secondo frammento di 870 bp (nt 6232-nt 7101) del gene L1 di HPV-18 è stata ottenuta utilizzando la coppia di primer **L1\_18\_2F** e **L1\_18\_2R**:

**L1\_18\_2F** 5' - **CCA Ygg RCT TTA gTA CAT TgC AAg ATA-** 3'[\*]

nt 6232-nt 6258 sulla sequenza di riferimento HPV-18 Europea X05015, primer anti-sense,  $T^{\circ}m$  50°C.

**L1\_18\_2R** 5' - **gTT TAg AAg ACg TAg Ygg CAg Atg g** - 3' [\*]

nt 7077-nt 7101 sulla sequenza di riferimento HPV-18 Europea X05015, primer anti-sense,  $T^{\circ}m$  49°C.

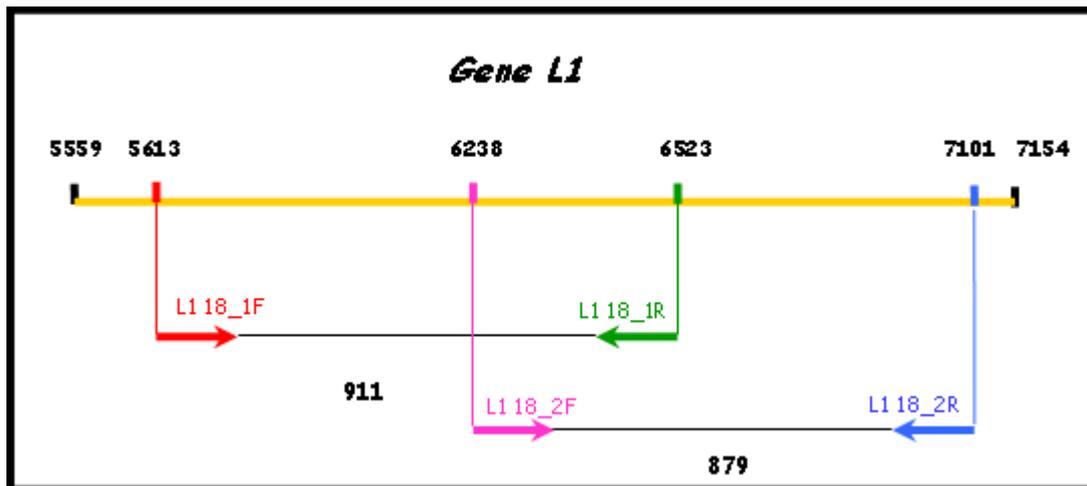
[\* Y = C o T; R = A o G;]

In una miscela di reazione con un volume finale di 50 µl sono stati aggiunti: 5 µl di DNA estratto, 10 µl di 5x *Green GoTaq® Reaction Buffer* (7,5mM MgCl<sub>2</sub>; Ph 8,5), 1 µl di dNTPs (10 mM), 1 µl di ciascun primer (30 pmoli/µl), 0,25 µl di Taq (5 U/µl) (*GoTaq® DNA polymerase, Promega*) e H<sub>2</sub>O per biologia molecolare (*Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, Italia*) fino al volume finale.

La PCR è stata condotta utilizzando un termociclatore (*Thermal cycler, Perkin Elmer 9700, USA*) alle seguenti condizioni:

N° CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94°C x 5'		
40	94°C x 1'	60°C x 1'	72°C x 1'
1			72°C x 7'

Nella Figura 21 è schematizzato il gene L1 ed i prodotti d'amplificazione ottenuti con le coppie di primer L1\_18\_1F/L1\_18\_1R e L1\_18\_2F/L1\_18\_2R. I frammenti genici ottenuti dalle due reazioni sono stati quindi sottoposti a sequenziamento. La sovrapposizione delle loro sequenze ha permesso di analizzare l'intero gene L1 (1489 pb). L'analisi delle sequenze ha così consentito l'individuazione di eventuali varianti geniche di HPV-18 L1.



**Figura 21:** Schema del gene L1 e dei prodotti di PCR per HPV-18.

I prodotti di amplificazione sono stati evidenziati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente 0,01 µg/ml di etidio bromuro.

La corsa elettroforetica è stata condotta ad un voltaggio di 120 mV per 60 minuti. Gli amplificati d'interesse sono stati riconosciuti mediante confronto con un opportuno marker di riferimento (*PCR 100 bp Low Ladder, BioLabs, New England*).

- **PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE**

I prodotti di amplificazione dei saggi di PCR, dopo corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1%, sono stati purificati e concentrati attraverso l'utilizzo di un kit commerciale (*NucleoSpin® Extract II, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany*).

Il protocollo di purificazione si articola in 5 fasi:

1. i frammenti genici sono stati excisi dal gel d'agarosio e pesati su una bilancia di precisione;
2. ogni 100 mg di agarosio excisi sono stati aggiunti 200 µl di Buffer NT in un tubo di raccolta e sono stati incubati per 5-10 minuti a 50°C in un incubatore, fino ad ottenere la completa dissoluzione del gel. I campioni sono stati, dunque, vorticati brevemente per 2-3 minuti in modo da dissolvere completamente il gel;
3. il campione è stato, dunque, caricato in una colonna inserita all'interno di un tubo di raccolta da 2 ml e centrifugato per 1 minuto a 14.000 rpm. Il materiale di scarto è stato successivamente eliminato;

4. il campione è stato successivamente sottoposto ad un lavaggio tramite l'aggiunta di 600 µl di Buffer NT3. Al lavaggio sono seguite due centrifughe la prima a 14.000 rpm per un minuto e la seconda sempre a 14.000 rpm per 2 minuti, che hanno permesso di rimuovere il Buffer NT3 in eccesso;
5. la colonna è stata, infine, trasferita in un nuovo tubo di raccolta di 1,5 ml e al campione sono stati addizionati 50 µl di Buffer di eluizione NE e, dopo un'incubazione di circa un minuto a temperatura ambiente, il campione è stato eluito attraverso un'ultima centrifuga a 14.000 rpm per un minuto e conservato a -20°C fino al momento del sequenziamento.

- **SEQUENZIAMENTO DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE**

I prodotti di amplificazione, purificati e concentrati, sono stati sequenziati mediante l'utilizzo di un sequenziatore capillare *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.)* con la collaborazione di un laboratorio esterno alla sezione di Virologia.

Il processo di sequenziamento ha inizio con una reazione di polimerizzazione.

A tale scopo viene utilizzato un kit commerciale (*ABI PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing*) contenente una soluzione composta da 4 didesossinucleotidi terminatori (ddNTPs), marcati con 4 fluorocromi diversi, (dTTP 15,79 mM, Tris-HCl 48,42 mM pH 9.1, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,21 mM) e l'enzima termostabile AmpliTaq FS DNA-polimerasi 0,42 U/ml.

I ddNTPs sono così definiti in quanto mancano del gruppo idrossile in posizione 3', coinvolto nella formazione del legame fosfodiesterico tra i nucleotidi che costituiscono le molecole di DNA. Pertanto, quando i ddNTPs marcati vengono incorporati al posto dei normali didesossinucleotidi la reazione di polimerizzazione si arresta.

Per il processo di polimerizzazione è stato utilizzato un enzima termostabile in grado di lavorare anche a temperature molto alte, riducendo la formazione di strutture secondarie nonché la formazione di legami tra i primer e le sequenze non specifiche.

L'AmpliTaQ FS DNA polimerasi, inoltre, facilita l'incorporazione dei ddNTPs nella catena del DNA in formazione. Essa, infatti, è una variante della consueta polimerasi *Thermus aquaticus*, contenente una mutazione puntiforme a livello del sito attivo, responsabile di una ridotta capacità di discriminazione nei confronti dei ddNTPs.

Una volta terminata la reazione di polimerizzazione, grazie ad un rilevatore laser che eccita le molecole fluorescenti, è possibile riconoscere i ddNTPs incorporati nella catena di DNA e, quindi, risalire alla sequenza nucleotidica d'interesse.

La sequenza del prodotto di amplificazione del frammento genico del virus influenzale è stata ottenuta dalla lettura degli elettroferogrammi dei due frammenti amplificati per ogni virus influenzale. La lettura dell'elettroferogramma è stata eseguita attraverso la lettura dei picchi. La sequenza dei picchi, infatti, corrisponde alla sequenza dei nucleotidi dell'amplificato e il colore del picco identifica in modo univoco un tipo di base azotata. Normalmente l'elettroferogramma è interpretato, in modo automatico, dal software utilizzato per il sequenziamento, tuttavia, se l'interpretazione non risulta ovvia, il sistema di lettura inserisce una N al posto della base azotata mancante. La sequenza può essere, così, corretta manualmente dopo una lettura manuale dell'elettroferogramma.

- **ANALISI FILOGENETICA DELLE SEQUENZE DELLA REGIONE LCR DI HPV-16 E HPV-18**

Tutte le sequenze nucleotidiche della regione regolatoria LCR di HPV-16 e HPV-18 sono state studiate filogeneticamente per individuare le varianti geografiche. Le sequenze sono state confrontate tra loro e con i ceppi di riferimento della regione regolatoria LCR di HPV-16 e HPV-18 presenti nella banca dati elettronica di sequenze genetiche GenBank [289].

In particolare, sono state riconosciute 4 diverse varianti geografiche per HPV-16: variante Europea (GenBank Accession number: AF536179), variante Africana-1 (AF536180), variante Africana-2 (AF472509) e variante Asiatico-Americana (AF402678). La variante Asiatica (AF534061) viene considerata una variazione minore della variante Europea.

Per HPV-18 si distingue solo tra varianti Europee (Europea X05015, Asiatico-Americana AY262282) e varianti non Europee (Africana-1 EF202155 e Africana-2 EF202152).

L'allineamento multiplo delle sequenze in studio è stato effettuato mediante l'utilizzo del programma bioinformatico ClustalX (versione 2.0) [290].

L'allineamento multiplo consiste in un'ipotesi di omologia posizionale tra basi azotate, rappresentato sotto forma di una tabella costituita da righe, corrispondenti alle sequenze omologhe, e da colonne, corrispondenti a ciascun sito dell'allineamento. L'ipotesi di omologia posizionale consiste nel ritenere che tutti i residui presenti nella

stessa colonna di un allineamento multiplo siano evolutivamente correlati.

L'allineamento multiplo è stato realizzato utilizzando algoritmi di allineamento globale, che quindi considerano l'intera lunghezza delle sequenze in esame. Questo tipo di procedura è veloce e consente l'allineamento multiplo di un gran numero di sequenze in un tempo limitato.

Il miglior allineamento fra due sequenze è quello in cui viene associato il più alto punteggio di similarità determinato in base ai parametri prescelti (matrici di sostituzione e *gap penalties*).

Gli alberi filogenetici delle sequenze della regione regolatoria LCR di HPV-16 e HPV-18 per la determinazione delle varianti geografiche sono stati costruiti utilizzando il programma bioinformatico MEGA (versione 4.0) [291].

L'albero filogenetico è stato costruito attraverso l'utilizzo del metodo *Neighbor-Joining* [292], che consente di generare alberi senza radice basandosi sulle matrici di distanza con un'elevata efficienza e rapidità, dando una lunghezza dei rami proporzionale alla distanza genetica tra le unità tassonomiche; ed è stato utilizzato il modello *Kimura 2 parametri* [293].

La robustezza dell'albero filogenetico ottenuto è stata determinata tramite l'analisi di *Bootstrap*, con un valore di *Bootstrap* pari a 1000 replicati. Questo test prevede un ricampionamento casuale delle sequenze analizzate. In questo modo si ottengono due alberi filogenetici: uno effettivo, ossia quello relativo alle sequenze in analisi, in cui sono riportate le distanze genetiche, ed un secondo albero che rappresenta quello che si otterrebbe con un campione casuale. Nel secondo albero è riportato il numero di volte che compare una certa ramificazione sul totale dei ricampionamenti eseguiti. Questo numero fornisce una stima di veridicità del risultato. In ambito virologico è da considerare significativo un valore di *bootstrap* maggiore di 70 [294].

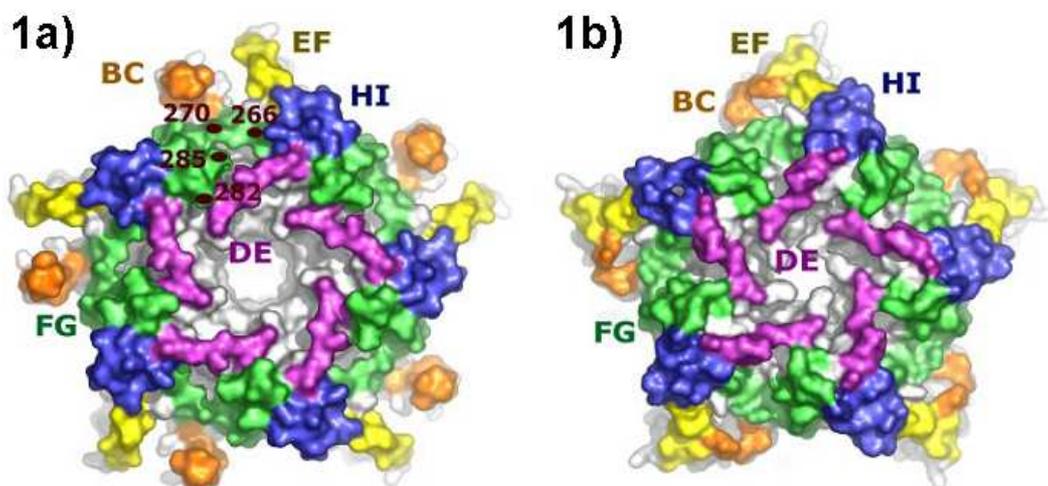
- **CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL GENE CODIFICANTE PER LA PROTEINA L1 DI HPV-16 E HPV-18**

I file di allineamento delle sequenze nucleotidiche del gene codificante per la proteina L1 di HPV-16 e di HPV-18 sono stati trasformati in file di allineamento di sequenze aminoacidiche attraverso l'utilizzo del programma bioinformatico *BioEdit* (versione 7.0.9.0)[295].

Le sequenze aminoacidiche sono codificate dal codice IUPAC ad una lettera degli aminoacidi.

Il file di allineamento delle sequenze aminoacidiche sono stati utilizzati per la ricerca di variazioni aminoacidiche a livello dei siti immunoepitopici nelle sequenze L1 in studio.

Sia per HPV-16 sia per HPV-18 sono noti in letteratura [296] le posizioni aminoacidiche di 5 siti immunoepitopici della proteina L1 riconosciuti dal sistema immunitario dell'ospite per produrre anticorpi neutralizzanti contro il virus (Figura 22). Inoltre, è nota la posizione aminoacidica del dominio  $\alpha$ -4, fondamentale per la formazione delle VLP costituenti il vaccino.



**Figura 22:** Epitopi immunodominanti: BC (arancio), DE (viola), EF (giallo), FG (verde), and HI (blu). 1a) HPV-16 L1, in particolare l'epitopo neutralizzante FG; 1b) HPV-18 L1.

In particolare per HPV-16 i siti immunoepitopici sono così rappresentati sulla sequenza di riferimento della proteina L1 della variante Europea (AF536179): epitopo BC dall'aminoacido (aa) 74 all'aa 96, epitopo DE dall'aa 136 all'aa 179, epitopo EF dall'aa 196 all'aa 215, epitopo FG dall'aa 287 all'aa 317 ed epitopo HI dall'aa 374 all'aa 386. Il dominio  $\alpha$ -4 si trova, invece, dall'aa 438 all'aa 454 [296].

Per HPV-18 sulla sequenza di riferimento della proteina L1 della variante Europea (X05015): epitopo BC dall'aminoacido (aa) 110 all'aa 131, epitopo DE dall'aa 171 all'aa 214, epitopo EF dall'aa 231 all'aa 250, epitopo FG dall'aa 322 all'aa 352 ed epitopo HI dall'aa 409 all'aa 422. Il dominio  $\alpha$ -4 si trova, invece, dall'aa 475 all'aa 490 [296].

Gli alberi filogenetici delle sequenze della proteina L1 di HPV-16 e HPV-18 per la determinazione delle mutazioni aminoacidiche sono stati costruiti utilizzando il programma bioinformatico *MEGA* (versione 4.0) [291].

L'albero filogenetico è stato costruito attraverso l'utilizzo del metodo *Neighbor-Joining* [292] ed è stato utilizzato il modello *Amino-Poisson correction* [297].

La robustezza dell'albero filogenetico ottenuto è stata determinata tramite l'analisi di *Bootstrap* [294], con un valore di *Bootstrap* pari a 1000 replicati.

- **ANALISI DELLE MUTAZIONI SINONIME E NON SINONIME DELLA PROTEINA L1 DI HPV-16 E HPV-18**

Le distanze relative alle mutazioni sinonime ( $d_s$ ) e non sinonime ( $d_N$ ) e, in particolar modo, il valore ( $d_N-d_s$ ), nonché i relativi Errori Standard (ES), sono stati stimati attraverso l'utilizzo del pacchetto di programmi bioinformatici *MEGA* (versione 4.0.) [291].

L'analisi è stata condotta mediante il metodo *Nei-Gojobori* [298], modello *Jukes-Cantor* [299], che assume che le mutazioni avvengono con la stessa probabilità per le 4 basi azotate.

Il metodo *Nei-Gojobori* [298] stima le distanze relative alle mutazioni sinonime ( $d_s$ ) e non sinonime ( $d_N$ ) calcolando il numero di sostituzioni sinonime e non sinonime rispetto al totale dei siti potenziali sinonimi e non sinonimi presenti nella sequenza nucleotidica.

L'Errore Standard (ES) delle distanze relative alle mutazioni sinonime e non sinonime ottenute e del valore ( $d_N-d_s$ ) è stato calcolato attraverso il metodo di *Bootstrap* (1000 replicati) [294].

La significatività del valore ( $d_N-d_s$ ) è stata valutata mediante il calcolo del "valore z" dato da:

- $$z = D/S(D) \quad (D= d_N-d_s; \quad S(D)= [ES' ]^2 + (ES'' )^2]^{1/2}$$

con  $ES'/ES'' =$  errore standard di  $d_N/d_s$

Questo valore è stato ottenuto mediante il z-test [298] appositamente presente nel pacchetto di programmi bioinformatici *MEGA* (versione 4.0.) [291].

- **ANALISI DI SELEZIONE POSITIVA E NEGATIVA SUI CODONI DELLA PROTEINA L1 DI HPV-16 E HPV-18**

L'analisi di codoni selezionati positivamente o negativamente all'interno delle sequenze della proteina L1 di HPV-16 e HPV-18 in studio è stata condotta attraverso l'utilizzo del web-server bioinformatico DataMonkey (*Rapid Detection of Positive Selection*) [300] del pacchetto bioinformatico HyPhy [301].

Il web-server bioinformatico DataMonkey [300] lavora su un albero filogenetico costruito partendo dall'allineamento delle sequenze nucleotidiche in studio (metodo *Neighbor-Joining* [292], modello *Tamura-Nei* [302]).

Il metodo **PARRIS** (*A PARTitioning approach for Robust Inference of Selection*) [303] permette di constatare la presenza di selezione positiva operante all'interno delle sequenze contenute nel file di allineamento (massimo 40 sequenze). La veridicità del dato ottenuto è indicata dal valore di *p-value*.

Successivamente, è stata condotta un'analisi comparativa attraverso l'utilizzo dei metodi **SLAC**, **FEL** e **REL** [304] per individuare la presenza di selezione positiva o negativa al livello dei singoli codoni delle sequenze contenute nel file di allineamento. I codoni, generalmente, sono selezionati positivamente quando la mutazione presente contribuisce ad incrementare in modo vantaggioso la fitness virale o, comunque, aumenta la diversità genetica virale. I codoni selezionati negativamente, invece, mostrano la presenza di mutazioni deleterie che tendono ad essere eliminate dalla popolazione virale in quanto non vantaggiose.

Il metodo **SLAC** (*Single Likelihood Ancestor Counting*) [304] stima per ogni codone i valori  $d_N$  e  $d_S$  come il rapporto tra i siti di sostituzione e il numero di sostituzioni; se  $d_N > d_S$  indica selezione positiva a livello del codone, se  $d_N < d_S$  indica selezione negativa. Questo metodo permette di utilizzare un allineamento di circa 150 sequenze.

Il metodo **FEL** (*Fixed Effects Likelihood*) [304] stima per ogni codone delle sequenze contenute nel file di allineamento due parametri:  $\alpha$ , tasso di siti con mutazioni sinonime, e  $\beta$ , tasso di siti con mutazioni non sinonime; se  $\alpha > \beta$  indica selezione negativa a livello del codone, se  $\alpha < \beta$  indica selezione positiva. Questo metodo permette di utilizzare un allineamento di circa 50 sequenze.

In entrambi i metodi l'analisi statistica è condotta mediante il valore di *p-value*.

Il metodo **REL** (*Random Effects Likelihood*) [304], infine, permette di stimare, per ogni codone, il tasso di distribuzione indipendente delle mutazioni sinonime ( $d_S$ ) e non sinonime ( $d_N$ ) all'interno delle sequenze dell'allineamento. Questo metodo permette di utilizzare un allineamento di circa 40 sequenze. Per ogni codone sono ottenuti due *fattori di Bayes* (BF), uno per l'evento di selezione negativa ( $d_N < d_S$ ) e uno per l'evento di selezione positiva ( $d_N > d_S$ ). Quando questi *fattori di Bayes* sono sufficientemente grandi ( $\geq 50$ ), può essere definito il tipo di selezione avvenuta a livello del codone delle sequenze in studio. Il valore  $1/BF$ , per l'analisi statistica, è analogo al valore di *p-value*.

### 3.6. DETERMINAZIONE DEI SEROVAR DI *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

- **AMPLIFICAZIONE MEDIANTE NESTED-PCR DI UN FRAMMENTO DEL GENE *OMP*A DI *CHLAMYDIA TRACHOMATIS***

I campioni risultati positivi all'amplificazione per il plasmide criptico batterico sono stati sottoposti ad un saggio di nested-PCR specifico il gene *OmpA* della proteina maggiore di membrana MOMP [286].

#### **PRIMO STEP**

Il primo step amplificava un segmento di 450 pb (nt 203-nt 680) tramite l'utilizzo della coppia di primer **MOMP-1F** e **MOMP-1R**:

**MOMP-1F** 5'-TTg TTT TCg ACC gTg TTT Tg -3'

nt 203-nt 222 sul gene *ompA*, primer sense,  $T^{\circ}m$  63,4°C.

**MOMP-1R** 5'- AgC RTA TTg gAA AgA AgC BCC TAA -3'[\*]

nt 657-nt 680 sul gene *ompA*, primer sense,  $T^{\circ}m$  63,4°C.

[\* R = A o G, B = C, G o T]

In una miscela di reazione con un volume finale di 50  $\mu$ l sono stati aggiunti: 0,5  $\mu$ g di DNA estratto, 10  $\mu$ l di 5x *Green GoTaq@Reaction Buffer* (7,5mM MgCl<sub>2</sub>; Ph 8,5), 1  $\mu$ l di dNTPs (10 mM), 1  $\mu$ l di ciascun primer MOMP-1F e MOMP-1R (25 pmoli/ $\mu$ l), 0,25  $\mu$ l di Taq (5 U/ $\mu$ l) (*GoTaq@ DNA polymerase, Promega*) e H<sub>2</sub>O per biologia molecolare (*Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, Italia*) fino al volume finale.

La reazione di amplificazione genica (PCR) è stata eseguita utilizzando un termociclatore (*Thermal cycler, Perkin Elmer 9700, USA*) alle seguenti condizioni:

N°CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94°C x 5'		
30	94°C x 30''	50°C x 30''	72°C x 30''
			72°C x 7'

## SECONDO STEP

Nel secondo step è stato amplificato un frammento di 395 pb (nt 223-nt 636), interno al segmento amplificato durante il primo step, utilizzando la coppia di primer **MOMP-2F** e **MOMP-2R**:

**MOMP-2F** 5'- AAA CWg ATg TgA ATA AAg ART T -3' [\*]

nt 223-nt 244 sul gene *ompA*, primer sense,  $T^{\circ}m$  55,9°C.

**MOMP-2R** 5'- TCC CAS ARA gCT gCD CgA gC -3' [\*]

nt 617 - nt 636 sul gene *ompA*, primer sense,  $T^{\circ}m$  58,6°C.

[\* W = A o T, R = A o G, S = C o G, D = A o G o T]

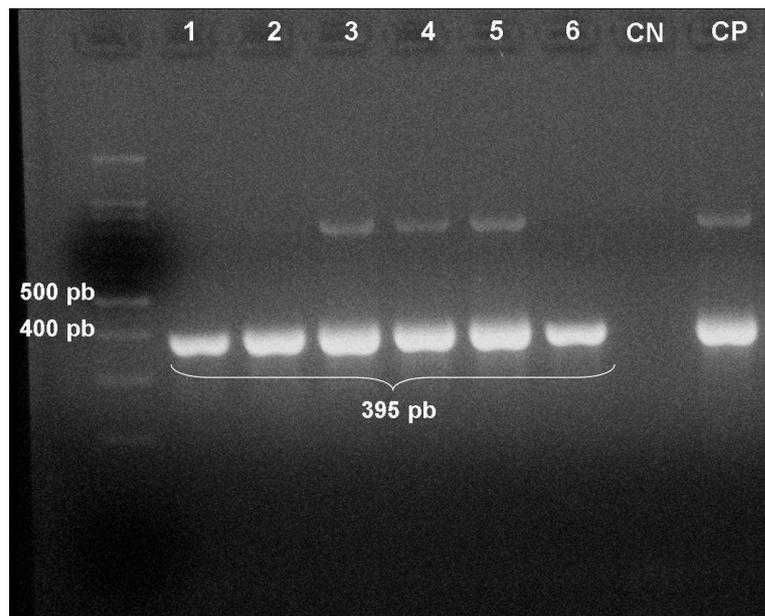
In una miscela di reazione con un volume finale di 50  $\mu$ l sono stati aggiunti: 2  $\mu$ l di amplificato dal primo step, 10  $\mu$ l di 5x *Green GoTaq® Reaction Buffer* (7,5mM MgCl<sub>2</sub>; Ph 8,5), 1  $\mu$ l di dNTPs (10 mM), 1  $\mu$ l di ciascun primer (25 pmoli/ $\mu$ l), 0,25  $\mu$ l di Taq (5 U/ $\mu$ l) (*GoTaq® DNA polymerase, Promega*) e H<sub>2</sub>O per biologia molecolare (*Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, Italia*) fino al volume finale.

La reazione di amplificazione genica (PCR) è stata eseguita utilizzando un termociclatore (*Thermal cycler, Perkin Elmer 9700, USA*) alle seguenti condizioni:

N°CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94°C x 5'		
25	94°C x 30''	50°C x 30''	72°C x 30''
1			72°C x 7'

### • VISUALIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR

I prodotti di amplificazione sono stati evidenziati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente 0,01  $\mu$ g/ml di etidio bromuro. La corsa elettroforetica è stata eseguita ad un voltaggio di 120 mV per 60 minuti. L'amplificato d'interesse è stato riconosciuto mediante confronto con un opportuno marker di riferimento (*PCR 100 bp Low Ladder, BioLabs, New England*) (Figura 23).



**Figura 23.** Elettroforesi su gel di agarosio al 2% di una PCR per l'amplificazione di un frammento di 395 bp del gene *OmpA*.

- **PURIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE**

Gli amplificati ottenuti dalla reazione di *nested*-PCR specifica per un frammento di 395 pb del gene *OmpA* per la proteina maggiore di membrana sono stati purificati mediante il kit *NucleoSpin®.Extract II* (*Macherey-Nagel GmbH, Germany*) che permette la purificazione del DNA amplificato da sali, primer, dNTPs in eccesso e dall'enzima Taq DNA-polymerase, come già precedentemente descritto.

Successivamente gli amplificati purificati sono stati inviati ad un laboratorio esterno alla Sezione di Virologia per il sequenziamento dei frammenti amplificati con kit commerciale (*ABI PRISM. Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing*) e sequenziatore capillare *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*).

- **ANALISI FILOGENETICA DELLE SEQUENZE**

Le sequenze nucleotidiche del gene *OmpA* sono state allineate, mediante il programma *ClustalX 2.0* [290], con le sequenze di riferimento dei 18 serovar di *Chlamydia trachomatis* estrapolate da *GenBank* [289] (serovar A: NC007429; serovar B: AF304856; Ba: AF063194; serovar C: AF352789; serovar D: NC000117; serovar Da: X62921; serovar E: X52557; serovar F: X52080; serovar G: AF063199; serovar H: X16007; serovar I: AF063200; serovar Ia: AF202456; serovar J: AF063202; serovar Ja: AF063203; serovar K: AF063204;

serovar L1: M36533; serovar L2: M14738; serovar L3: X55700). L'allineamento ottenuto è stato quindi analizzato con il programma *BioEdit* 7.0.1 [295].

L'analisi filogenetica delle sequenze è proseguita utilizzando il programma *MEGA* versione 4.0 [291]. L'albero filogenetico per l'identificazione dei serovar è stato condotto utilizzando il metodo *Neighbor-Joining* modello *Kimura 2 parametri* [292, 293]. La robustezza dell'albero è stata determinata tramite l'analisi di *Bootstrap* [294].

### **3.7. ANALISI STATISTICA**

La prevalenza HPV tipo-specifico e dell'infezione da *C. trachomatis* sono state espresse come proporzione grezza con corrispettivo intervallo di confidenza (IC) del 95% calcolato con il test *mid-p exact* assumendo una distribuzione normale.

Le frequenze dei genotipi di HPV sono stati comparati tra di loro con il test del  $\chi^2$  basato sulla distribuzione binomiale; il test *Fisher's exact* è stato utilizzato per il confronto fra piccoli numeri. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo (distribuzione a 2 code). Il confronto fra le età è stato fatto utilizzando il test *t* per due campioni indipendenti con un intervallo di confidenza bilaterale del 95%.

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il programma OpenEpi versione 2.2.1 [305].

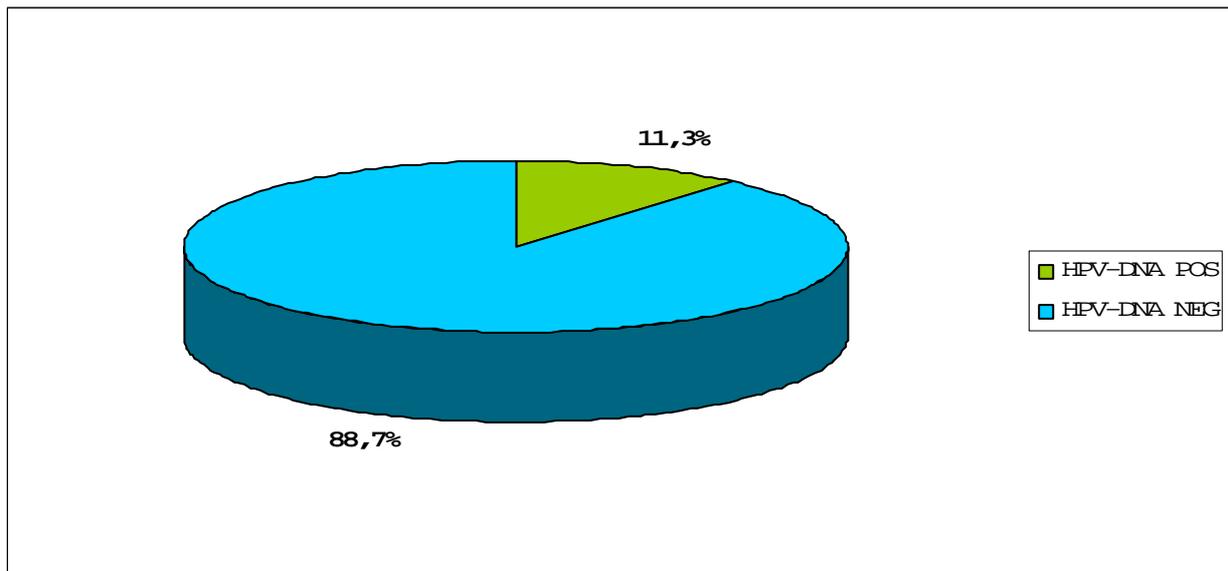
## **4. RISULTATI**

## 4.1 EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELLE INFEZIONI DA HPV E CHLAMYDIA TRACHOMATIS

### 4.1.1. PREVALENZA DI INFEZIONE DA HPV E CARATTERIZZAZIONE DEI PRINCIPALI GENOTIPI INFETTANTI IN DONNE DELLA POPOLAZIONE GENERALE FEMMINILE (25-64 ANNI), NORMALMENTE AFFERENTI A PROGRAMMI DI SCREENING

L'amplificazione genica specifica per un frammento dell'ORF L1 (450 bp) di HPV ha permesso di determinare la presenza di HPV-DNA nell'11,3% (78/688; IC95%:9,2-13,9) della popolazione in studio (Figura 24).

L'età media dei soggetti infetti per HPV era di 34 anni.



**Figura 24.** Prevalenza di infezione da HPV nella popolazione generale femminile (25-64 anni) in studio.

La successiva genotipizzazione mediante RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ha permesso di identificare i genotipi infettanti nel 96,1% (75/78) dei campioni HPV-positivi. In 3/78 (3,9%) campioni la carica virale non era sufficiente per consentire la tipizzazione.

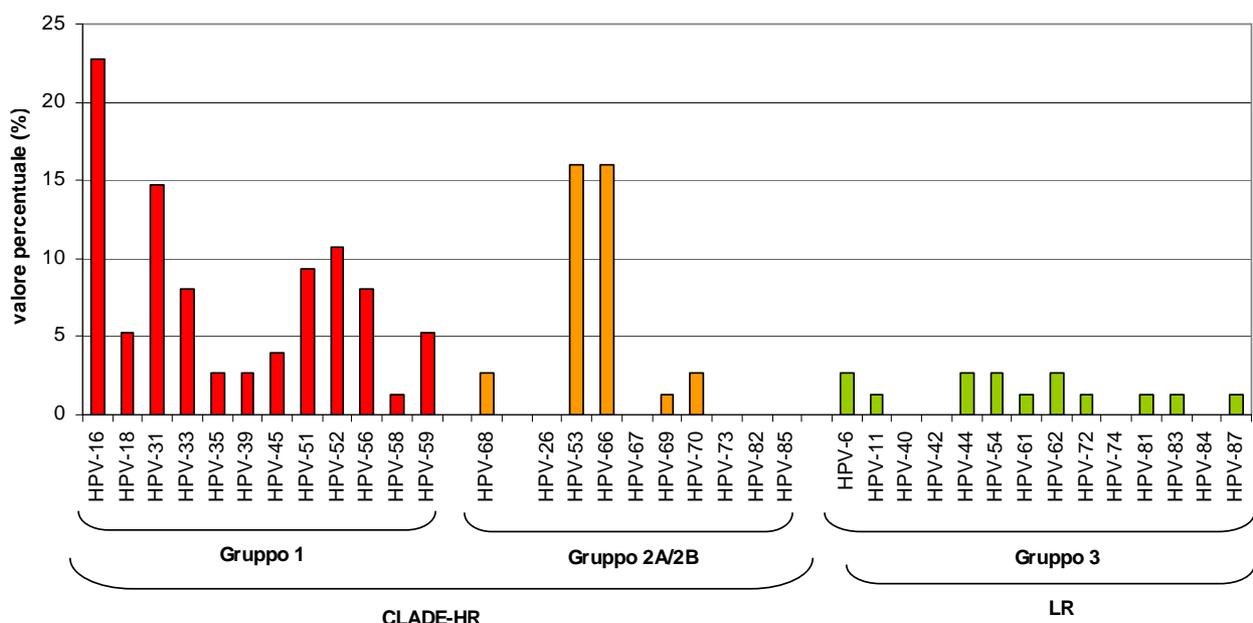
Nei campioni HPV-DNA positivi tipizzati è stato possibile identificare 28 diversi genotipi. Di questi, 17 (60,7%) sono inclusi nell'*High Risk-clade* (HR-clade), secondo la più recente classificazione dello IARC [62], 12 compresi nel Gruppo 1 (cancerogeni per l'uomo) e 5 nel Gruppo 2A-2B (probabili/possibili cancerogeni per l'uomo). I restanti 11 (39,3%)

genotipi identificati appartengono invece al Gruppo 3 dei genotipi a basso rischio oncogeno (*Low Risk*, LR).

I 28 genotipi hanno dato luogo a 116 infezioni, di cui 71 (61,2%) sostenute da genotipi appartenenti al Gruppo 1, 29 (25%) al Gruppo 2A-2B e 16 (13,8%) al Gruppo 3. Complessivamente, l'86,2% (100/116; IC95%: 78,7-91,4) delle infezioni era sostenuto da almeno un genotipo appartenente all'HR-clade, mentre il 13,8% (16/116; IC95%: 8,6-21,3) era attribuibile esclusivamente a genotipi LR (Mid-P exact <0,0000001).

Il genotipo più frequente è risultato HPV-16, presente nel 22,7% dei soggetti HPV-DNA positivi, seguito da HPV-31 (14,7%) e HPV-52 (10,7%), tutti inclusi nel Gruppo 1.

I genotipi HPV-53 e HPV-66, appartenenti al Gruppo 2A-2B, erano presenti ciascuno nel 16% dei soggetti HPV-DNA positivi (Figura 25).

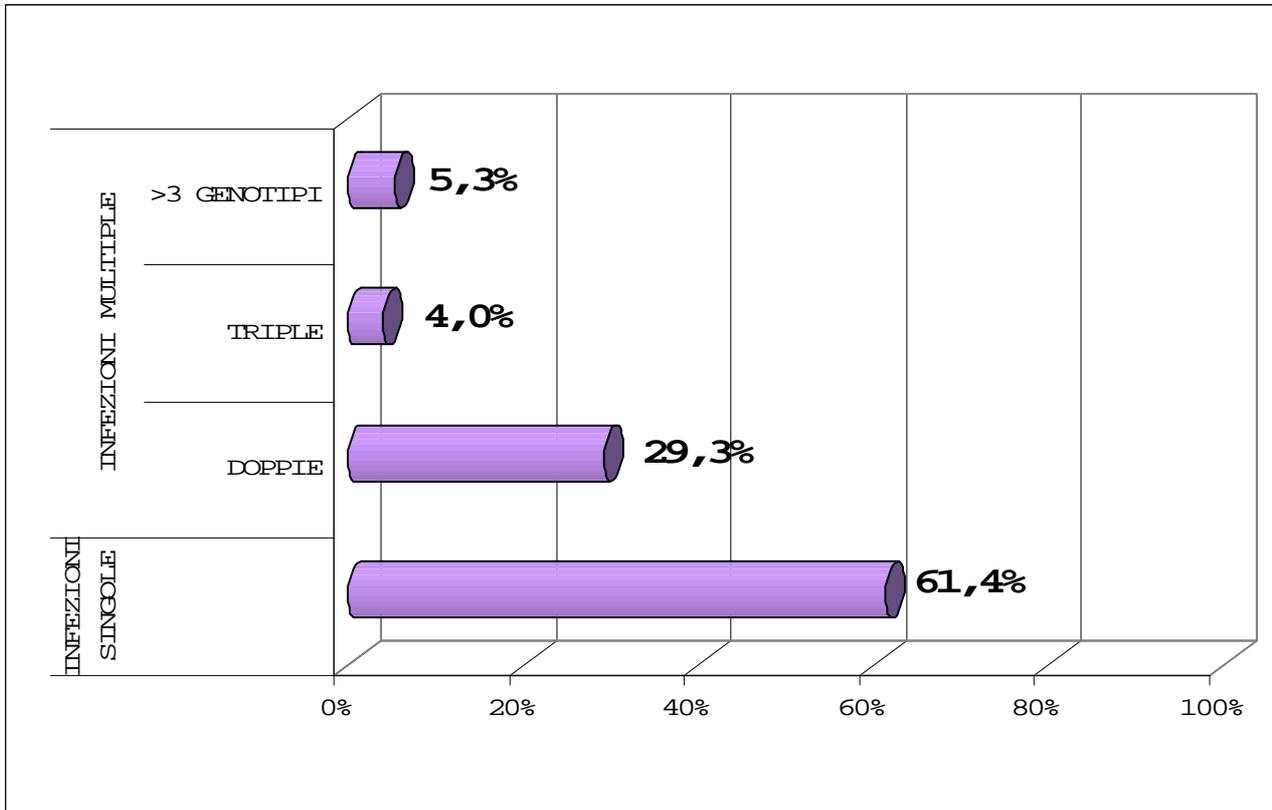


**Figura 25.** Prevalenza dei genotipi di HPV rilevati nella popolazione 25-64 anni.

Le infezioni da HPV riscontrate nei singoli soggetti erano sostenute da uno o più genotipi virali. In particolare, il 61,4% (46/75) delle donne HPV positive mostrava una infezioni singola, mentre il 38,6% (29/75) infezioni sostenute da più genotipi virali; in particolare, 22 (75,9%) donne presentavano un'infezione doppia, 3 tripla (10,3%), mentre 4 (13,8%) da più di 3 genotipi (Figura 26).

Le infezioni da singolo genotipo erano supportate per il 63% (29/46) da genotipi del Gruppo 1, per il 26% (12/46) da genotipi del Gruppo 2A-2B e

per il restante 11% (5/46) da genotipi del Gruppo 3. Solo il 3,5% (1/29) delle infezioni multiple era sostenuto da soli genotipi LR, mentre il restante 96,5% presentava almeno un genotipo appartenente all'HR-clade.



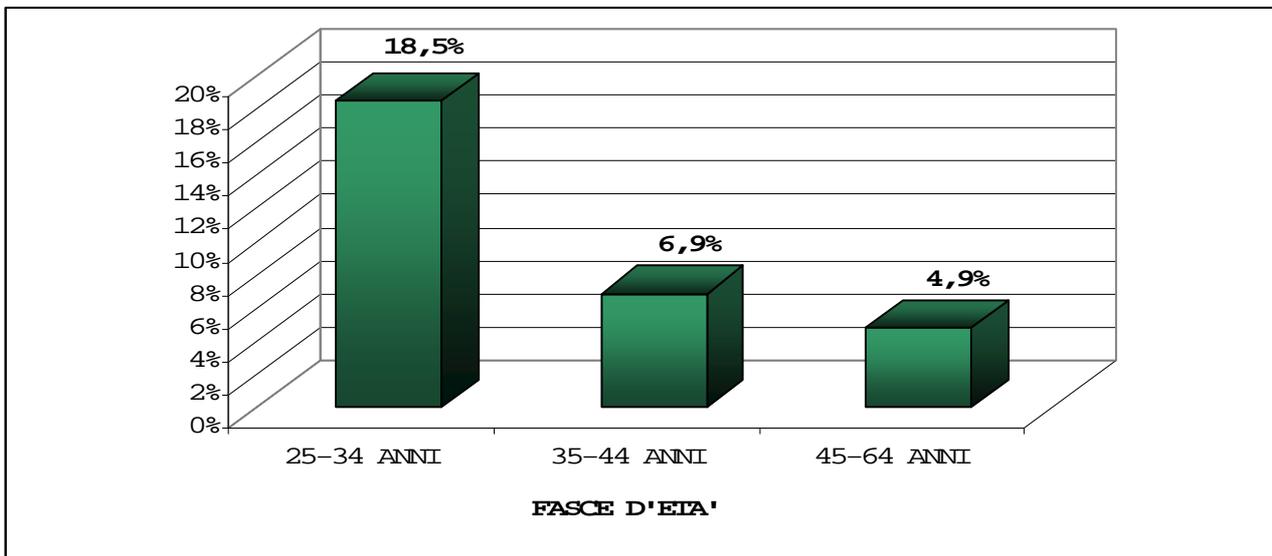
**Figura 26:** Frequenza delle infezioni singole e multiple nella popolazione in studio.

• **PREVALENZA DI INFEZIONE DA HPV E CARATTERIZZAZIONE DEI GENOTIPI INFETTANTI  
PER FASCIA D'ETÀ**

La popolazione in studio è stata suddivisa in tre fasce d'età: la prima comprendeva donne di età 25-34 anni (N = 281), la seconda di età 35-44 anni (N = 305) e la terza di età 45-64 anni (N = 102).

La prevalenza di infezione da HPV è risultata, rispettivamente, del 18,5% (52/281; IC95%: 14,4-23,5), del 6,9% (21/305; IC95%: 4,5-10,3) e del 4,9% (5/102; IC95%: 2,2-13,1) nelle tre fasce d'età (Figura 27).

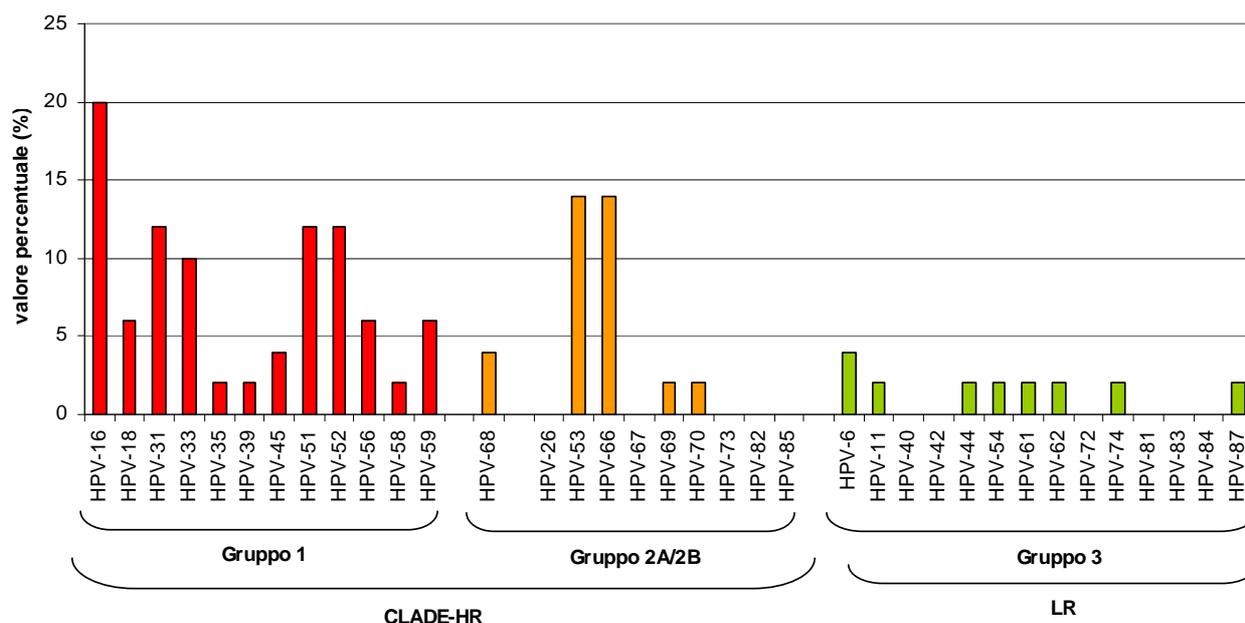
Il trend discendente è risultato statisticamente significativo confrontando i tassi di prevalenza osservati nella prima verso la seconda fascia d'età (Mid-P exact <0,00001).



**Figura 27.** Prevalenza di infezione da HPV nelle tre fasce d'età (popolazione 25-64 anni)

Nella **fascia d'età 25-34 anni** (età mediana 28 anni) la genotipizzazione, possibile per il 96,2% (50/52) dei campioni HPV-positivi, ha permesso di rilevare 25 diversi genotipi, presenti in 74 infezioni: 47 (63,5%) sostenute da 12 genotipi del Gruppo 1, 18 (24,3%) da 5 genotipi del Gruppo 2A-2B e 9 (12,2%) da 8 genotipi del Gruppo 3.

I genotipi più frequenti sono risultati: HPV-16 (20%), HPV-53 e HPV-56 (14% ciascuno), seguiti da HPV-31, HPV-51 e HPV-52 (12% ciascuno). Per quanto riguarda i genotipi LR (Gruppo 3), le prevalenze variavano dal 4% di HPV-6 al 2% di tutti gli altri genotipi rilevati (Figura 28).



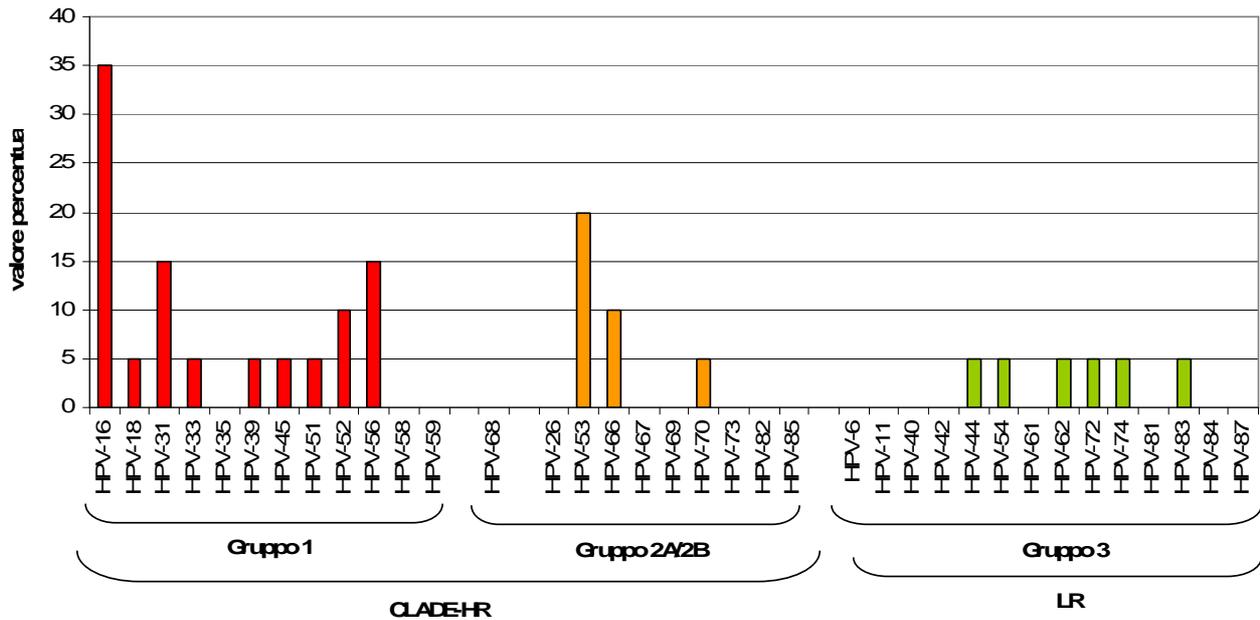
**Figura 28.** Prevalenza dei genotipi di HPV infettanti nella fascia d'età 25-34 anni.

In questa fascia d'età, nel 66% dei soggetti (33/50) le infezioni erano singole (per l'87,9% sostenute da genotipi dell'HR-clade), nel 34% (17/50) multiple (70,7% doppie, 17,6% triple e 11,7% da >3 genotipi) e tutte sostenute da almeno un genotipo dell'HR-clade.

Quindi, il 92% (46/50; IC95%:81,8-97,4) dei soggetti HPV positivi compresi in questa fascia d'età è risultato infetto da almeno un genotipo dell'HR-clade, mentre l'8% (4/50; IC95%: 2,6-18,2) da genotipi LR (Mid-P exact <0,001).

Nella **fascia d'età 35-44 anni** (età mediana 40 anni), il 95,2% (20/21) dei campioni HPV positivi è stato genotipizzato, identificando 33 infezioni sostenute da 18 diversi genotipi: 20 (60,6%) da 9 genotipi del Gruppo 1, 7 (21,2%) da 3 genotipi del Gruppo 2A-2B e 6 (18,2%) da 6 genotipi del Gruppo 3.

HPV-16 era il genotipo prevalente (35%), seguito da HPV-53, HPV-31 e HPV-56, riscontrati rispettivamente nel 20%, 15% e 15% dei casi. I genotipi LR identificati erano presenti con una frequenza del 5%(Figura 29).



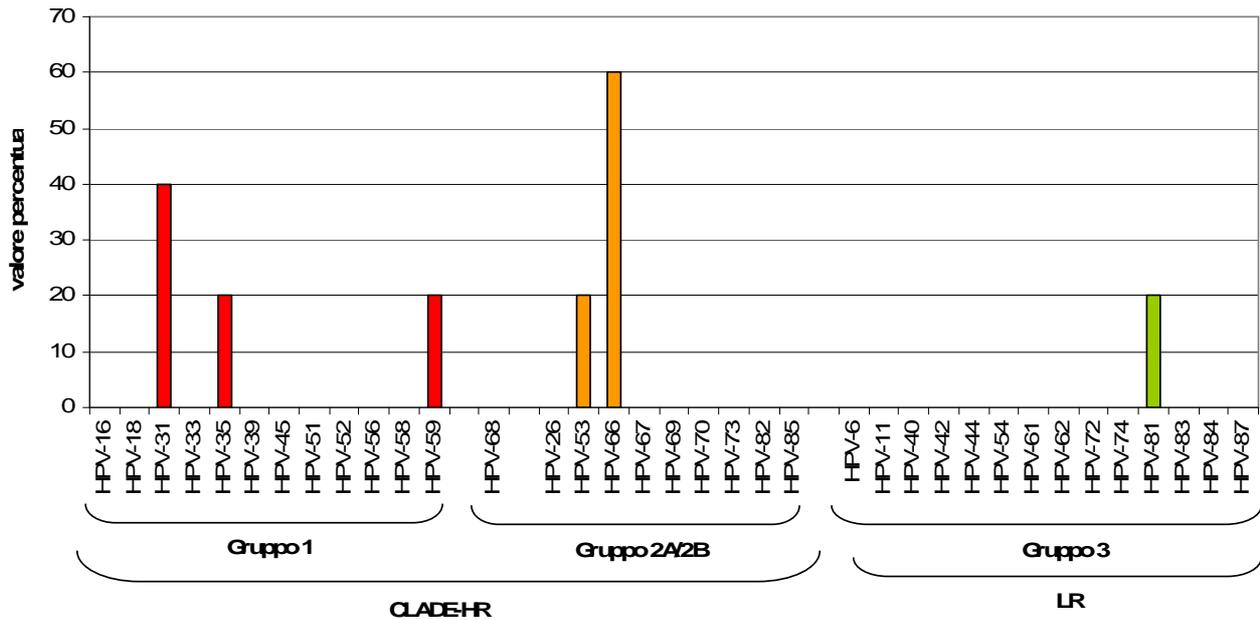
**Figura 29.** Prevalenza dei genotipi infettanti di HPV nella fascia d'età 35-44 anni.

Nel 60% dei soggetti (12/20) HPV positivi le infezioni erano singole (tutte attribuibili a genotipi dell'HR-clade), nel 40% (8/20) multiple (75% doppie e 25% da >3 genotipi), per l'87,5% sostenute da almeno un genotipo dell'HR-clade.

Quindi, il 95% (19/20; IC95%: 77,7-99,8) dei soggetti HPV positivi compresi in questa fascia d'età è risultato infetto da almeno un genotipo dell'HR-clade, mentre il 5% (1/20; IC95%: 0,322,5) da genotipi LR (Mid-P exact <0,001).

Nella **fascia d'età 45-64 anni** (età mediana 47 anni) sono stati identificati 5 soggetti infetti, con 9 infezioni sostenute da 6 diversi genotipi: 4 (44,5%) da 3 genotipi compresi nel Gruppo 1, 4 (44,5%) da 2 genotipi del Gruppo 2A-2B e 1 (11%) da un genotipo del Gruppo 3.

In questa fascia d'età il genotipo prevalente era HPV-66, riscontrato nel 60% dei soggetti HPV-DNA positivi (Figura 30).



**Figura 30.** Prevalenza dei genotipi infettanti di HPV nella fascia d'età 45-64 anni.

Solo un soggetto mostrava una infezione singola (da HPV-81, Gruppo 3), mentre nelle restanti donne (4/5, 80%) le infezioni erano multiple, tutte sostenute da 2 genotipi (1 del Gruppo 1 e 1 del Gruppo 2A-2B).

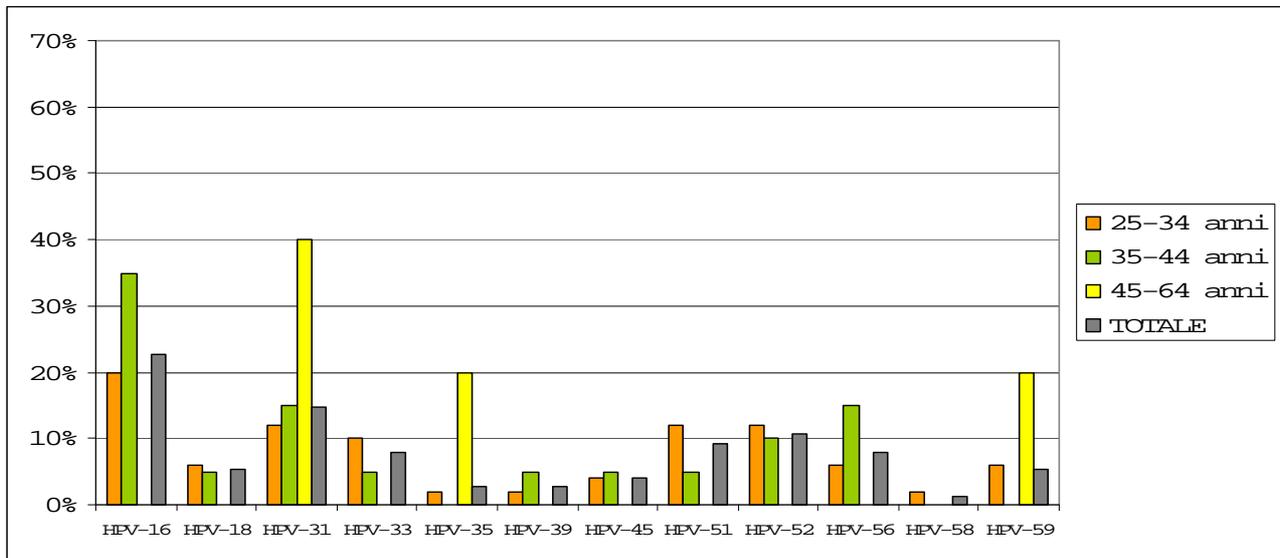
Complessivamente, l'80% (4/5; IC95%: 33,4-99) dei soggetti HPV-positivi è risultato infetto da almeno un genotipo appartenente all'HR-clade mentre il 20% (1/5; IC95%: 1-66,6) da genotipi del Gruppo LR.

Com'è possibile notare in Figura 31 (a-b-c) la distribuzione dei genotipi nelle 3 fasce d'età è risultata poco omogenea. Appare comunque evidente come i genotipi dell'HR-clade (Gruppo 1 e Gruppo 2A-2B) siano più rappresentati sia nella popolazione totale che nelle singole fasce d'età. In Figura 32 sono riportate le frequenze di infezioni singole e multiple riscontrate nelle donne HPV infette, suddivise per fascia d'età. Nelle prime due fasce d'età il rapporto tra infezioni singole e infezioni multiple rimane pressoché costante. Si osserva, invece, un aumento delle infezioni multiple nelle donne HPV positive della terza fascia d'età (45-64 anni).

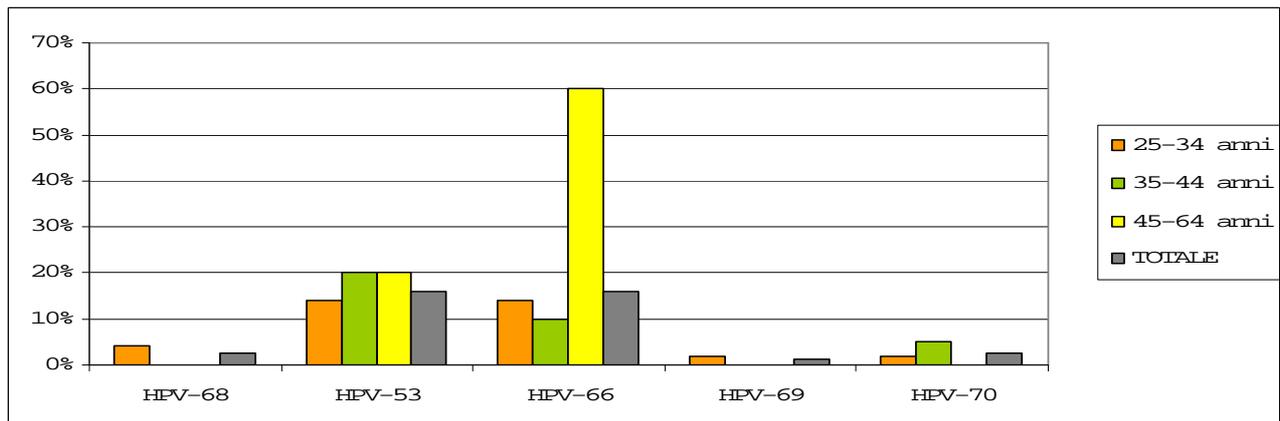
A conferma della maggiore diffusione dei genotipi dell'HR-clade nella popolazione in studio, in Figura 33 si nota come le infezioni sostenute da almeno un genotipo di questo clade siano prevalenti rispetto a quelle

attribuibili esclusivamente a LR-HPV (Mid-P exact <0,001), indipendentemente dalla classe d'età considerata.

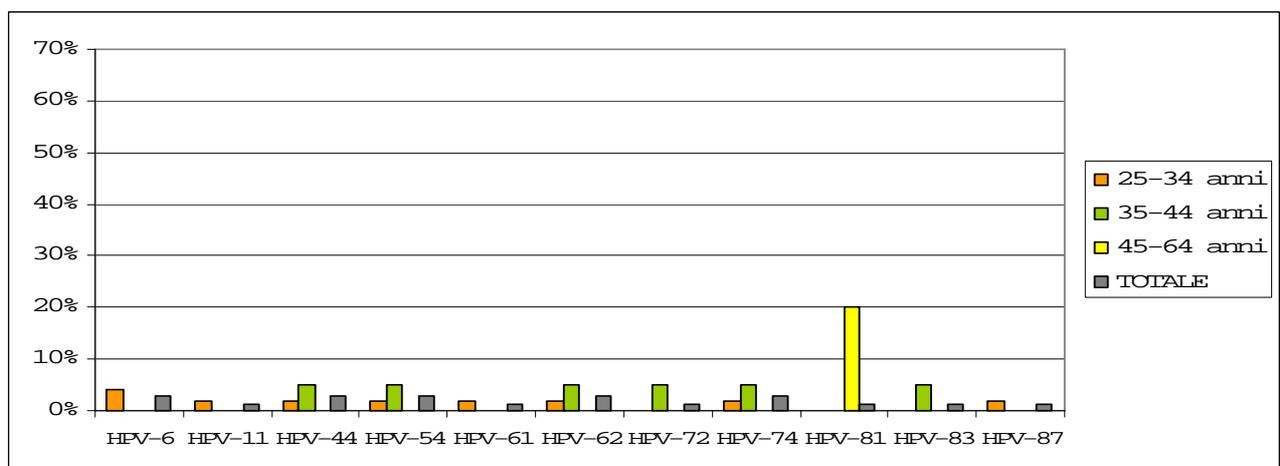
a)



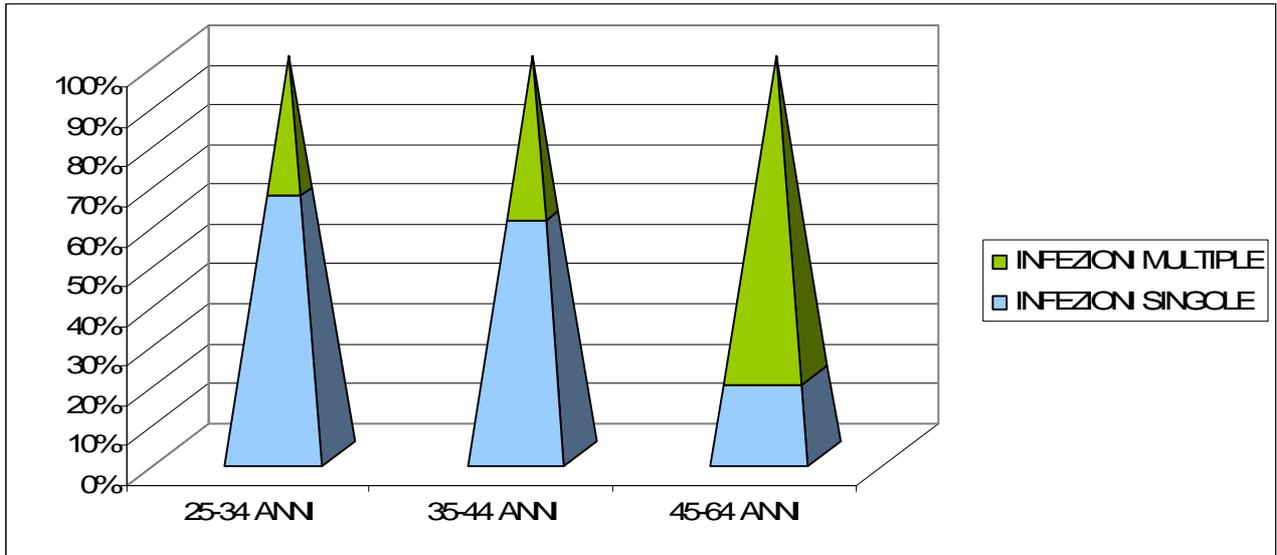
b)



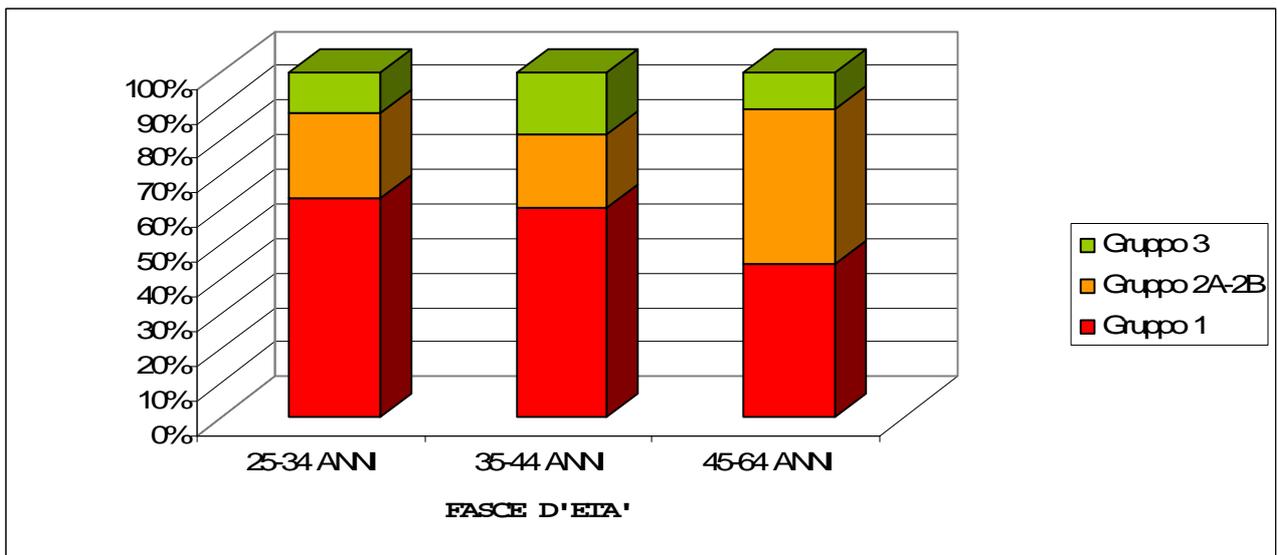
c)



**Figura 31.** Frequenza dei genotipi nella popolazione totale e nelle tre fasce d'età: a) genotipi Gruppo 1; b) genotipi Gruppo 2A/2B; c) genotipi Gruppo 3.



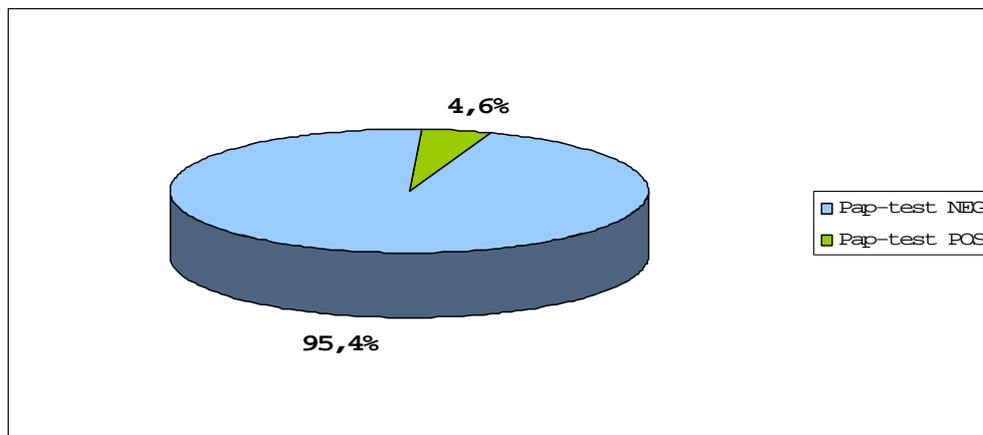
**Figura 32.** Frequenze di infezioni singole e multiple nelle 3 fasce d'età.



**Figura 33.** Frequenza delle infezioni da genotipi del gruppo 1, 2A-2B e 3 nelle tre fasce d'età.

• **CORRELAZIONE TRA ESITO DELL'INDAGINE CITOLOGICA E HPV NELLE DONNE DELLA POPOLAZIONE GENERALE FEMMINILE (25-64 ANNI)**

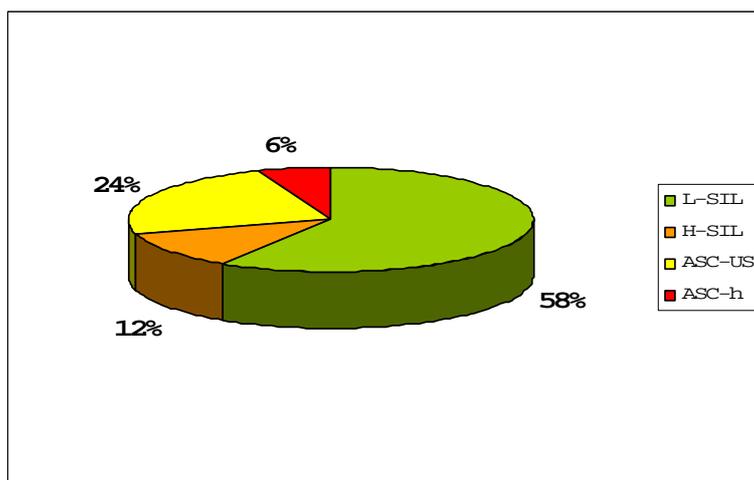
Per il 72,3% (501/688) dei campioni citologici raccolti è stato possibile avere il risultato del test citologico (Pap-test). Nel 95,4% (478/501) dei casi è stato riscontrato un esito di citologia normale, mentre nel 4,6% (23/501) dei campioni sono state diagnosticate alterazioni citologiche (Figura 34).



**Figura 34:** Esito del Pap-test eseguito su 501 campioni in studio.

Tra i 478 soggetti con citologia normale l'8,2% (39/478) è risultato HPV-DNA positivo, mentre tale percentuale si è attestata al 74% (17/23) tra le donne con alterazioni citologiche.

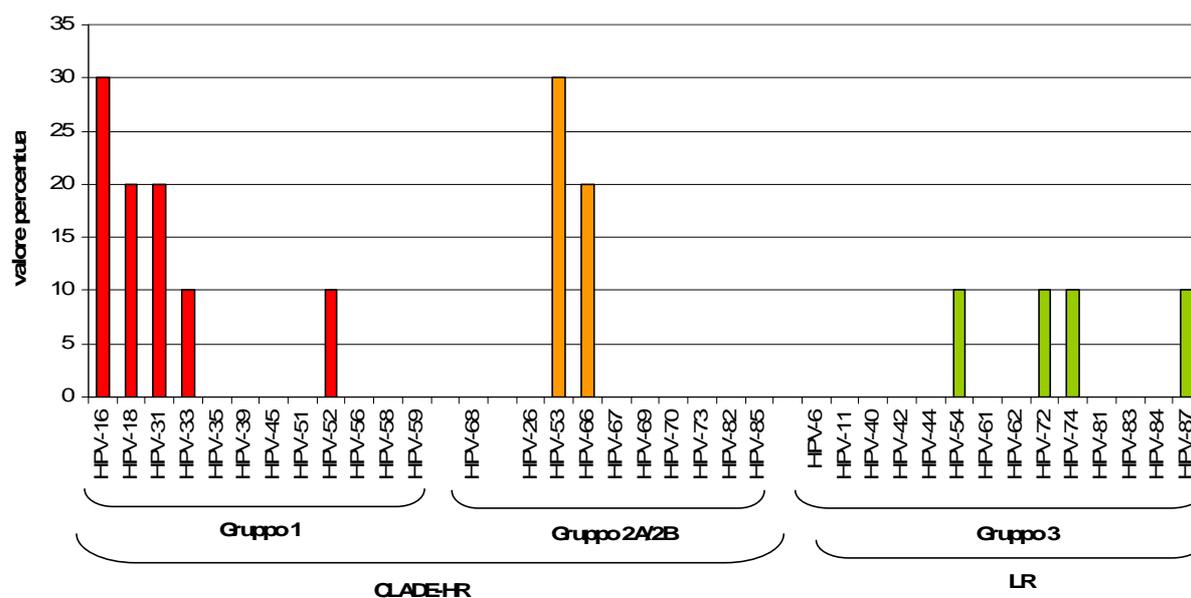
Tra le 17 donne HPV positive e con lesioni citologiche, il 58,8% (10/17) mostrava una lesione di basso grado (L-SIL), l'11,8% (2/17) una lesione di alto grado (H-SIL), il 23,5% (4/17) un ASC-US (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*) e il restante 5,9% un ASC-h (*Atypical Squamous Cells cannot exclude H-SIL*) (Figura 35). Due (33,3%) casi di ASC-US, 2 (33,3%) di L-SIL e 2 (33,3%) di ASC-h sono stati invece diagnosticati tra le 6 donne con Pap-test positivo, ma apparentemente senza infezione da HPV (HPV-DNA negative).



**Figura 35:** Tipologia e quota delle lesioni citologiche (L-SIL, H-SIL, ASC-US e ASC-h) rilevate nella popolazione in studio.

Le 10 donne con diagnosi citologica di L-SIL e HPV positive hanno presentato infezioni singole nel 70% dei casi, sostenute nel 42,8% (3/7) da genotipi del Gruppo 1, nel 42,8% (3/7) da genotipi del Gruppo 2A-2B e nel 14,4% (1/7) da genotipi del Gruppo 3. Dei 3/10 (30%) casi di co-infezione con più genotipi virali, le infezioni erano sostenute da almeno un genotipo appartenente al Gruppo 1.

Sono stati identificati 11 diversi genotipi: 5 del Gruppo 1, 2 del gruppo 2A-2B e 4 del Gruppo 3. I genotipi prevalenti erano HPV-16 e HPV-53 (30% ciascuno) (Figura 36).

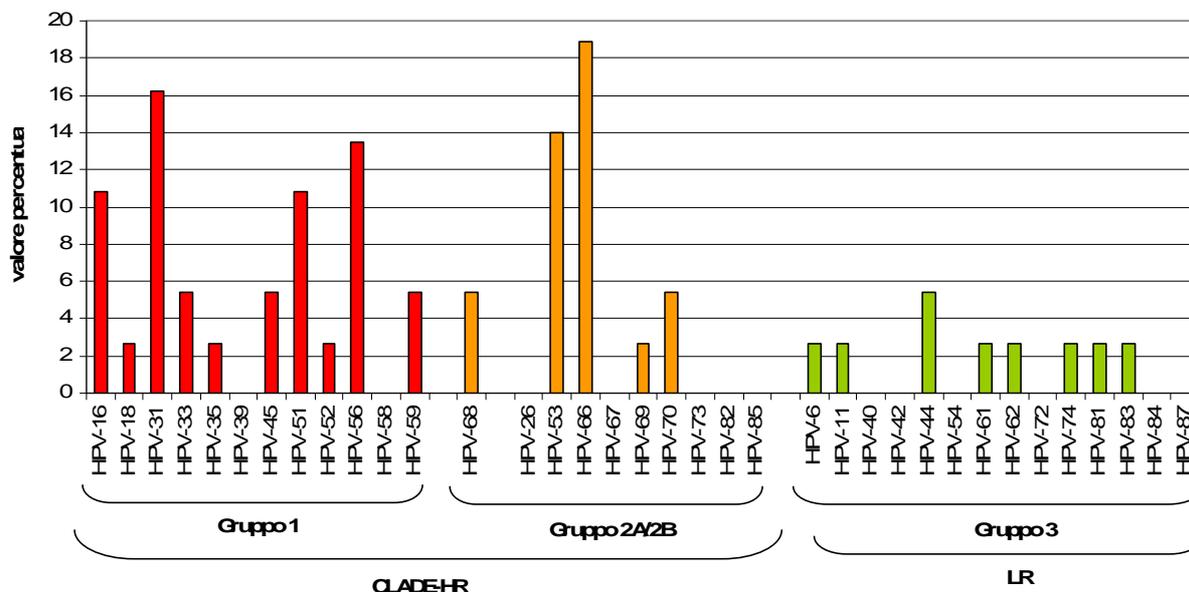


**Figura 36:** Prevalenza dei genotipi di HPV infettanti in donne con esito citologico di L-SIL.

Per quanto riguarda le donne con esito citologico di **H-SIL** (2/17), queste mostravano una infezione singola HPV-16 (Gruppo 1) positiva. Anche il soggetto con esito citologico di **ASC-h** è risultato infetto da HPV-16. Infine, tra i 4 casi di **ASC-US**, 2 donne erano infette rispettivamente da HPV-51 (Gruppo 1), HPV-45 (Gruppo 1), 1 mostrava una infezione multipla (HPV-16,-52,-66,-54), mentre in 1 soggetto non è stato possibile effettuare la genotipizzazione.

L'8,2% (39/478) delle donne HPV-infette era caratterizzata da **assenza di alterazioni citologiche** al Pap-test. Dei 39 rispettivi campioni biologici, 37 (94,9%) sono risultati genotipizzabili. Di questi, il 56,8% (21/37) presentava infezioni singole, sostenute da genotipi del Gruppo 1 nel 47,6%, da genotipi del Gruppo 2A-2B nel 38,1% e da genotipi del Gruppo 3 nel 14,3%. Del 43,2% (16/37) delle infezioni multiple, il 93,7% era sostenuto da almeno un genotipo appartenente al Gruppo 1 mentre una sola co-infezione era sostenuta da 2 genotipi appartenenti al Gruppo 3 (LR).

In Figura 37 sono riportati i 23 genotipi circolanti tra le donne con citologia normale: il prevalente è risultato HPV-53 (21,6%), seguito da HPV-66 (18,9%) e HPV-31 (16,2%).

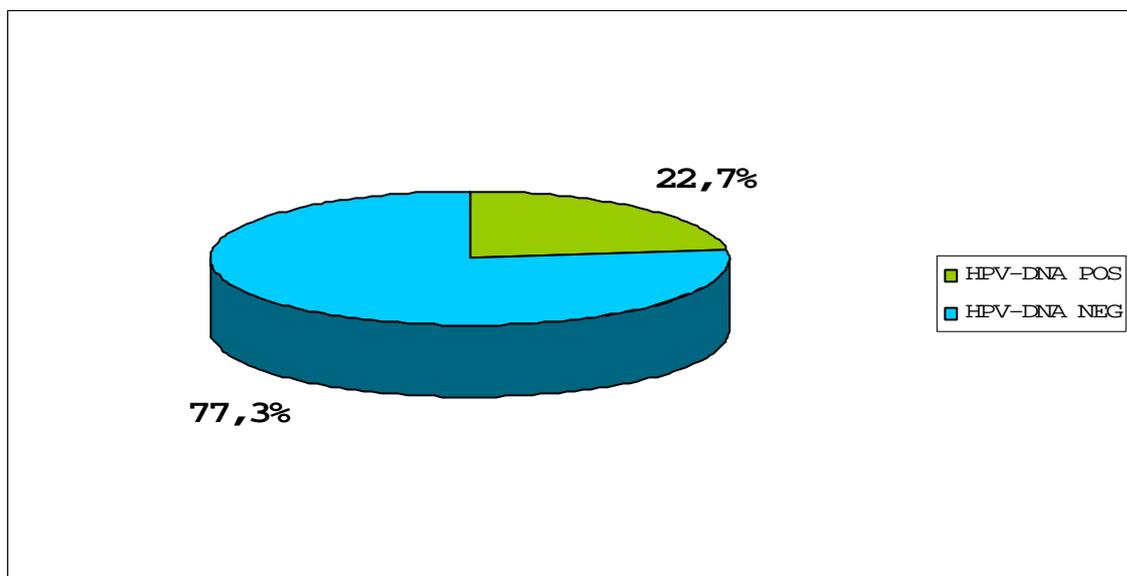


**Figura 37:** Prevalenza dei genotipi infettanti di HPV nelle donne con citologia normale.

#### 4.1.2 PREVALENZA DI INFEZIONE DA HPV E CARATTERIZZAZIONE DEI PRINCIPALI GENOTIPI CIRCOLANTI IN ADOLESCENTI/GIOVANI DONNE (13-24 ANNI) SESSUALMENTE ATTIVE

L'amplificazione genica specifica per un frammento dell'ORF L1 (450 bp) di HPV ha permesso di determinare la presenza di HPV-DNA nel 22,7% (128/563; IC95%: 19,5-26,4) della popolazione in studio (Figura 38).

L'età media dei soggetti infetti per HPV era di 20 anni.



**Figura 38.** Prevalenza di infezione da HPV nelle adolescenti/giovani donne (13-24 anni).

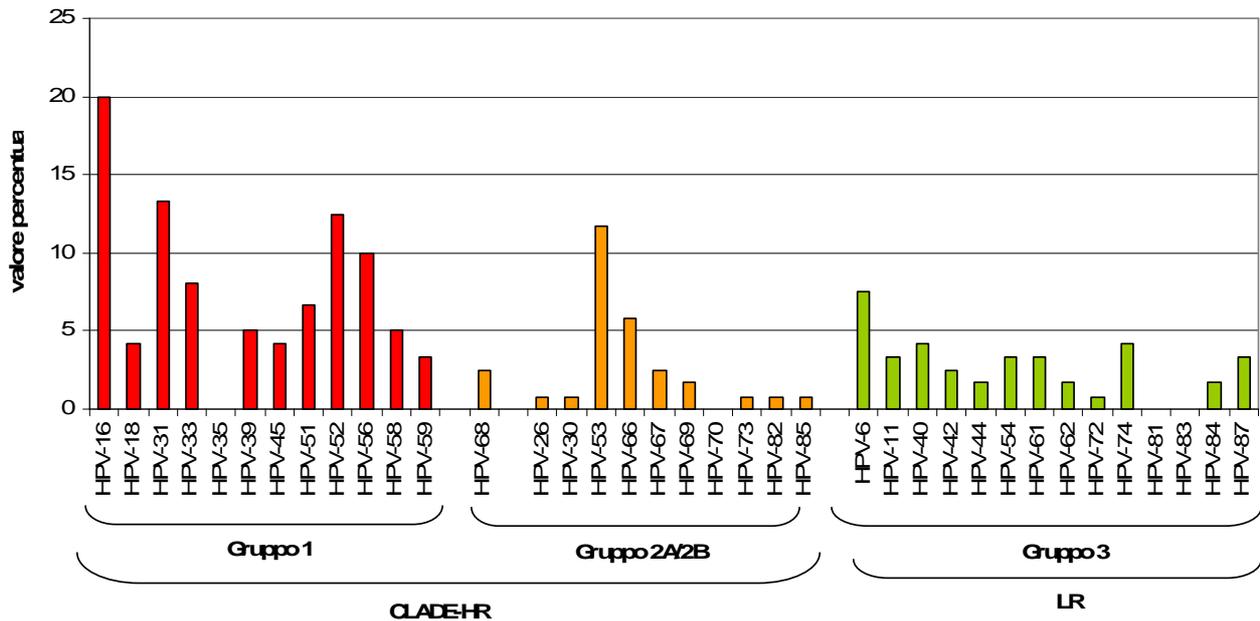
La successiva genotipizzazione mediante RFLP ha permesso di identificare i genotipi infettanti nel 94% (120/128) dei campioni HPV-positivi, mentre in 8/128 (6%) campioni la carica virale non era sufficiente.

Sono stati identificati 33 diversi genotipi: 21 (63,6%) inclusi nell'HR-clade (11 del Gruppo 1 e 10 del Gruppo 2A-2B), 12 (36,4%) appartenenti al Gruppo 3 (LR).

Tali genotipi erano presenti complessivamente in 182 infezioni, 103 (56,6%) sostenute dai genotipi del Gruppo 1, 34 (18,7%) del Gruppo 2A-2B e 45 (24,7%) del Gruppo 3.

Tra i genotipi del Gruppo 1, il più frequente è risultato HPV-16 (nel 20% dei soggetti HPV-DNA positivi), seguito da HPV-31 (13,3%), HPV-52 (12,5%) e HPV-56 (10%) (Figura 39).

HPV-66 è risultato il genotipo più frequente (5,8%) nel Gruppo 2A-2B, mentre HPV-6 il prevalente (7,5%) del Gruppo 3.

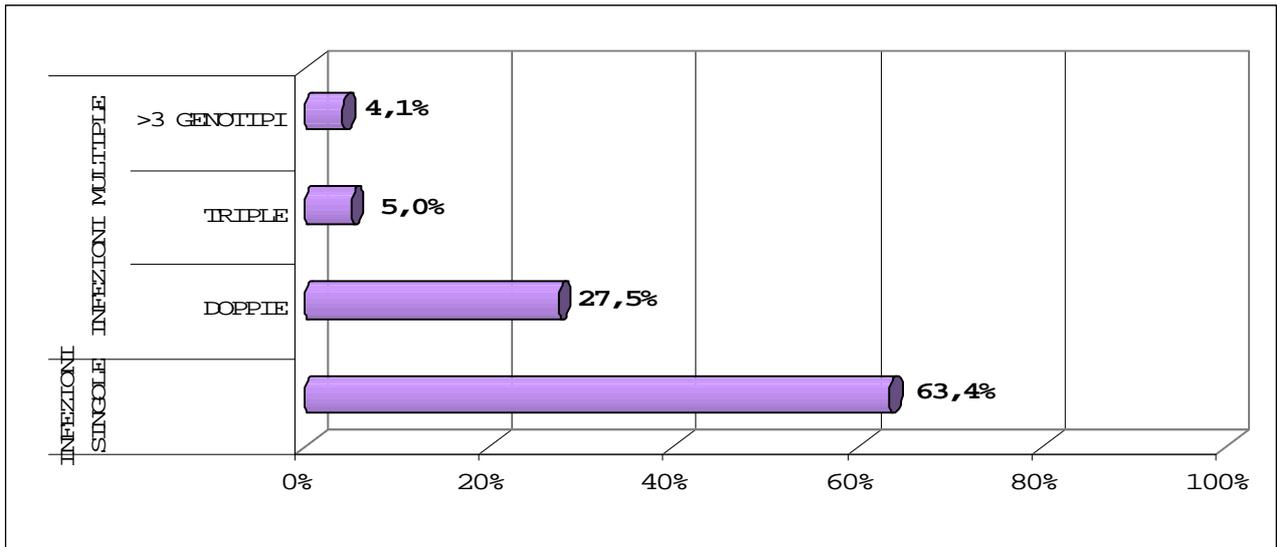


**Figura 39.** Prevalenza dei genotipi di HPV rilevati nelle adolescenti/giovani donne in studio.

Riguardo la frequenza di infezioni singole e multiple, il 63,4% (76/120) delle giovani donne era infetta da un singolo genotipo di HPV, mentre il 36,6% (44/120) da più genotipi e, in questo caso, si trattava prevalentemente di infezioni doppie (75%, 33/44) (Figura 40).

Le infezioni singole erano supportate per il 51,3% da genotipi del Gruppo 1, per il 18,4% da genotipi del Gruppo 2A-2B e per il 30,3% da genotipi del Gruppo 3. Solo il 2,3% (1/44) delle infezioni multiple era sostenuto da soli genotipi LR, mentre il restante 97,7% presentava almeno un'infezione da genotipi dell'HR-clade.

Complessivamente, l'80% (96/120; IC95%: 71,91-86,23) delle donne HPV-positive erano infette da almeno un genotipo appartenente all'HR-clade, mentre il 20% (24/120; IC95%: 13,77-28,09) da genotipi LR (Mid-P exact <0,0000001).

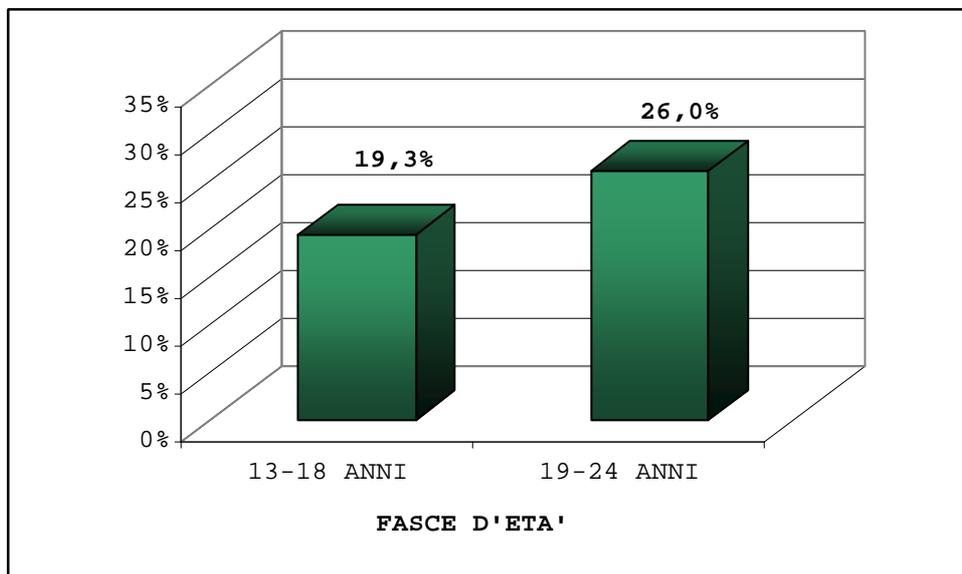


**Figura 40:** Frequenza di infezioni singole e multiple nelle adolescenti/giovani donne in studio.

• **PREVALENZA DI INFEZIONE DA HPV E CARATTERIZZAZIONE DEI GENOTIPI INFETTANTI  
PER FASCIA D'ETÀ**

La popolazione di giovani donne è stata suddivisa in due fasce d'età: la prima comprendeva donne di età compresa tra i 13 e i 18 anni (N=274), la seconda di età 19-24 anni (N=289).

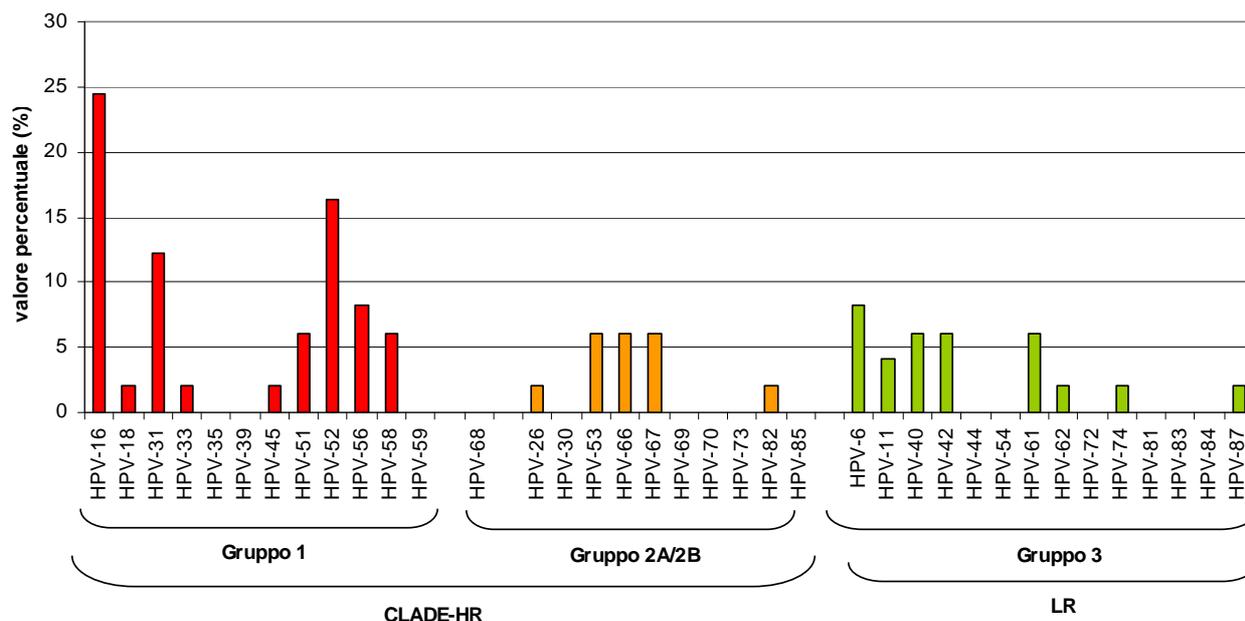
La prevalenza di infezione da HPV è risultata, rispettivamente, del 19,3% (53/274; IC95%:15,1-24,5) e del 26% (75/289; IC95%:21,2-31,3)(Figura 41). Tale differenza è risultata statisticamente significativa (Mid-P exact <0,03).



**Figura 41.** Prevalenza di infezione da HPV nelle due fasce d'età della popolazione di 13-24 anni in studio.

Nella **fascia d'età 13-18 anni** (età mediana 18 anni) la genotipizzazione, possibile per il 92,5% (49/53) dei campioni HPV-positivi, ha permesso di rilevare 22 diversi genotipi, presenti in 68 infezioni: 39 (57,4%) sostenute da 9 genotipi del Gruppo 1, 11 (16,2%) da 5 genotipi del Gruppo 2A-2B e 18 (26,4%) da 8 genotipi del Gruppo 3.

I genotipi più frequenti appartenevano al Gruppo 1: HPV-16, HPV-52 e HPV-31, rispettivamente riscontrati nel 24,5%, 16,3% e 12,2% dei soggetti HPV-positivi (Figura 42). Tra i genotipi LR, HPV-6 era presente nell'8,2% dei soggetti infetti.



**Figura 42.** Prevalenza dei genotipi di HPV infettanti nella fascia d'età 13-18 anni.

Nel 67,4% (33/49) delle giovani donne HPV positive le infezioni erano singole (54,6% sostenute da genotipi del Gruppo 1, 24,3% del Gruppo 2A-2B e 21,1% del Gruppo 3), mentre nelle restanti donne (16/49, 32,6%) le infezioni erano multiple, l'81,3% doppie e il 18,7% triple, tutte sostenute da almeno un genotipo dell'HR-clade.

Complessivamente, l'85,7% (42/49; IC95%: 73-93,2) dei soggetti HPV positivi è risultato infetto da almeno un genotipo appartenente all'HR-clade mentre il 14,3% (7/49; IC95%:6,8-27) da genotipi del Gruppo LR (Mid-P exact <0,0000001).

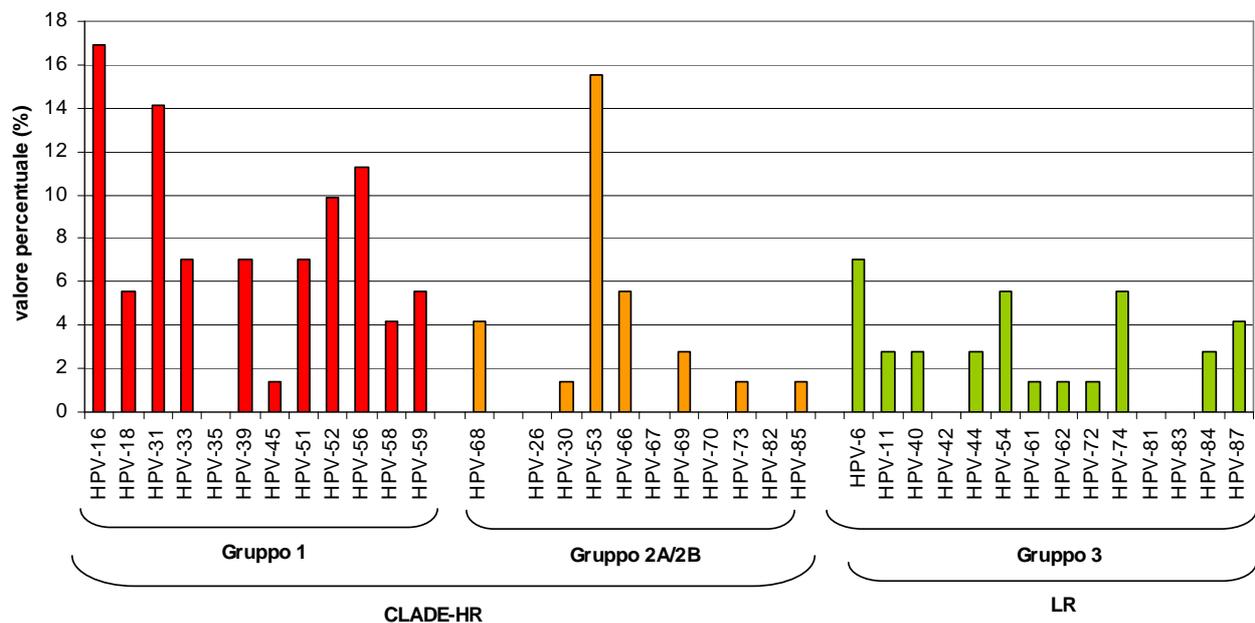
Nella **fascia d'età 19-24 anni** (età mediana 21 anni), il 94,7% (71/75) dei campioni HPV positivi è stato genotipizzato, identificando 114 infezioni sostenute da 29 diversi genotipi: 64 (56,1%) da 11 genotipi del Gruppo 1, 23 (20,2%) da 7 genotipi del Gruppo 2A-2B e 27 (23,7%) da 11 genotipi del Gruppo 3.

HPV-16, appartenente al Gruppo 1, era il genotipo prevalente (16,9%), seguito da HPV-53 (Gruppo 2A-2B) e HPV-31 (Gruppo 1), riscontrati rispettivamente nel 15,5% e 14,1 dei soggetti HPV positivi.

Tra i genotipi LR, HPV-6 è stato riscontrato nel 7% delle donne HPV positive (Figura 43).

Nel 60,6% (43/71) dei soggetti HPV positivi le infezioni erano singole (48,8% sostenute da genotipi del Gruppo 1, 16,3% del Gruppo 2A-2B e 34,9% del Gruppo 3); mentre nelle restanti donne (28/71, 39,4%) le infezioni erano multiple (il 71,4% doppie, l'10,7% triple e il 17,9% >3 genotipi) tutte sostenute da almeno un genotipo dell'HR-clade.

Complessivamente, il 78,9% (56/71; IC95%:67,9-86,9) dei soggetti HPV positivi è risultato infetto da almeno un genotipo appartenente all'HR-clade mentre il 21,1% (15/71; IC95%:13,1-32,1) da genotipi del Gruppo LR (Mid-P exact <0,0000001).



**Figura 43.** Prevalenza dei genotipi di HPV infettanti nella fascia d'età 19-24 anni.

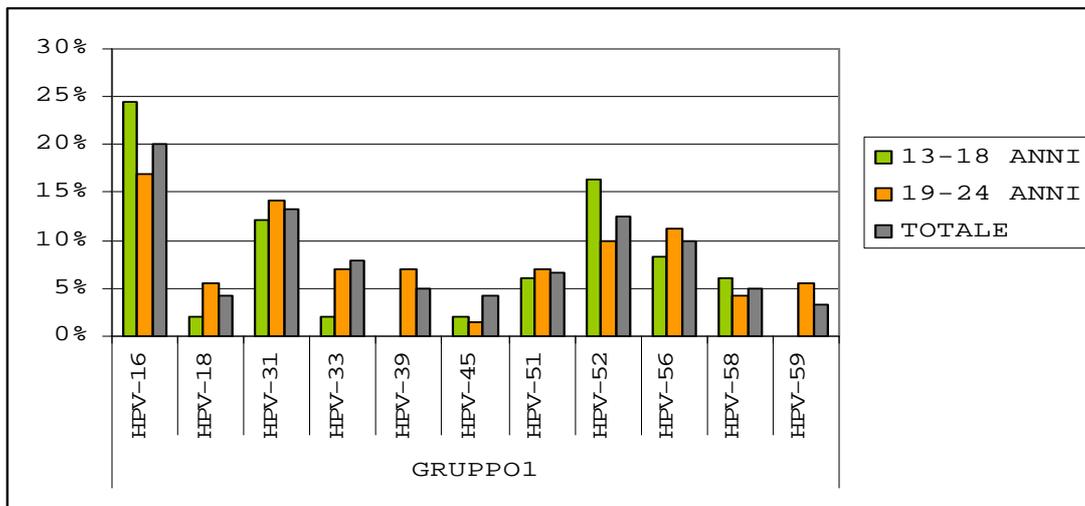
Com'è possibile notare in Figura 44 (a-b-c) la distribuzione dei genotipi nelle 2 fasce d'età evidenzia una prevalenza dei genotipi HPV-16, HPV-31, HPV-52 e HPV-56 appartenenti all'HR-clade. Tra i genotipi appartenenti al Gruppo 2A-2B, HPV-53 e HPV-66 erano i prevalenti in entrambe le fasce d'età, mentre HPV-6 era il prevalente del Gruppo 3.

In Figura 45 sono riportate le frequenze di infezioni singole e multiple riscontrate nelle donne HPV infette, suddivise nelle due fasce d'età. Si osserva un valore costante nel rapporto tra infezioni multiple e singole, con una maggiore presenza di queste ultime.

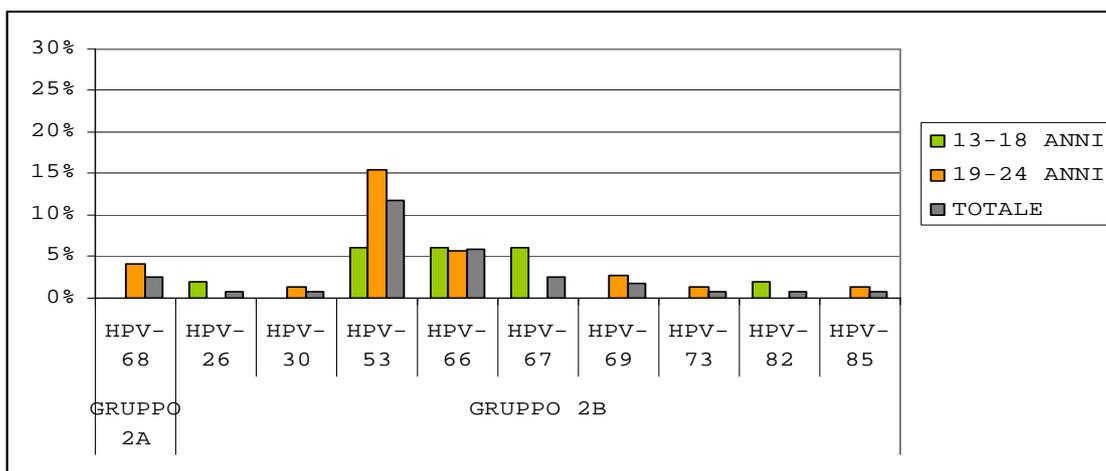
A conferma della maggiore diffusione di genotipi HR nella popolazione in studio, in Figura 46 si nota come le infezioni sostenute da almeno un genotipo dell'HR-clade siano prevalenti rispetto a quelle attribuibili

esclusivamente a LR-HPV (Mid-P exact <0,001), indipendentemente dalla classe d'età considerata.

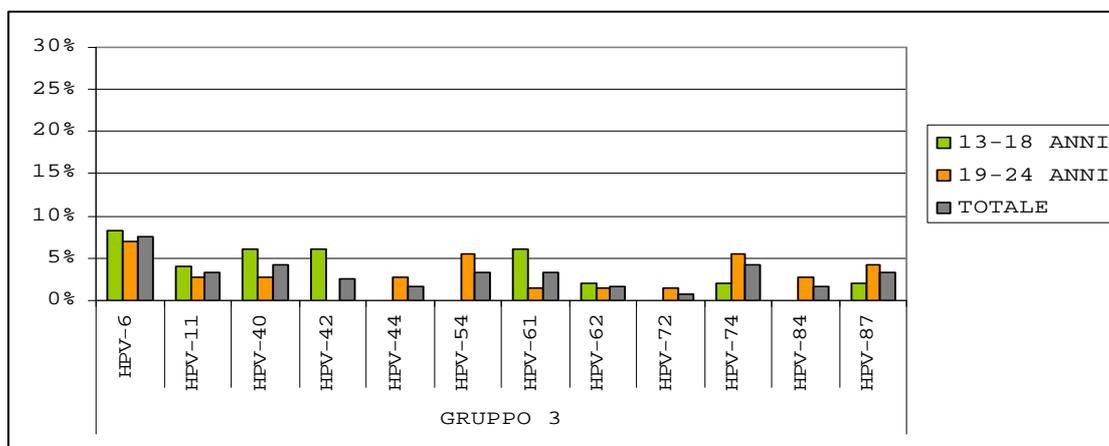
a)



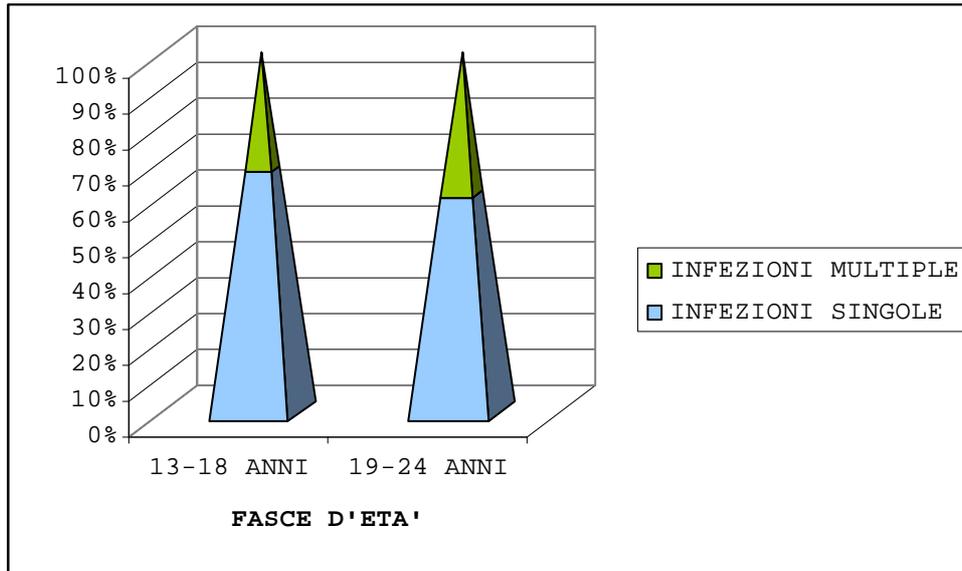
b)



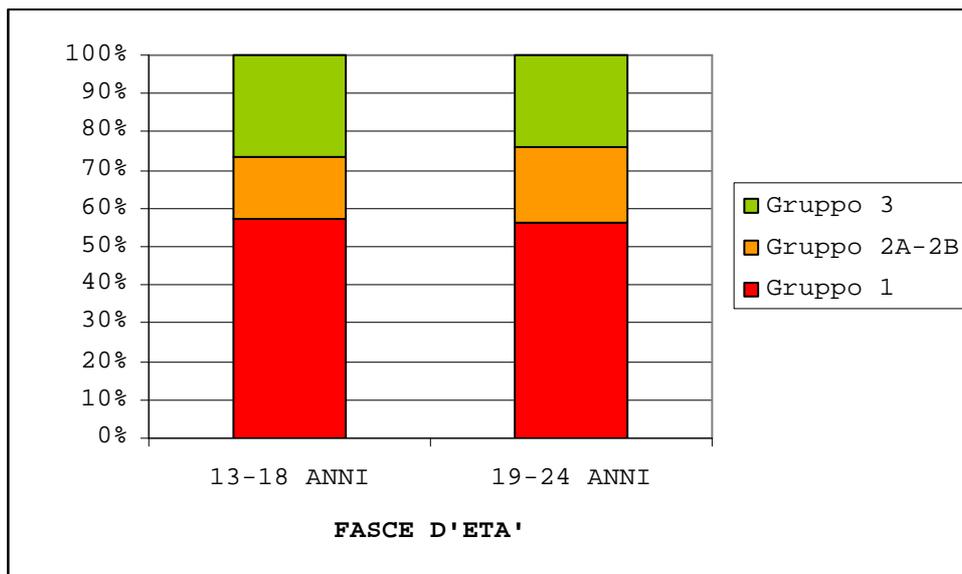
c)



**Figura 44.** Frequenza dei genotipi nella popolazione totale e nelle due fasce d'età: a) genotipi Gruppo 1; b) genotipi Gruppo 2A/2B; c) genotipi Gruppo 3.



**Figura 45.** Frequenze di infezioni singole e multiple nelle due fasce d'età considerate.

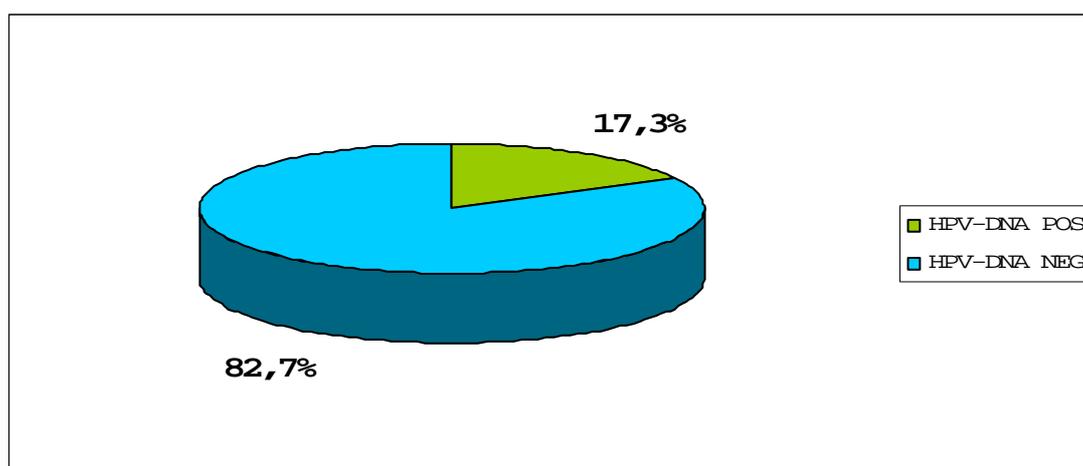


**Figura 46.** Frequenza delle infezioni da genotipi del gruppo 1, 2A-2B e 3 nelle due fasce d'età.

#### 4.1.3. PREVALENZA DI INFEZIONE DA HPV E CARATTERIZZAZIONE DEI PRINCIPALI GENOTIPI INFETTANTI IN ADOLESCENTI/GIOVANI DONNE SESSUALMENTE ATTIVE VACCINATE CON VACCINO ANTI-HPV

L'amplificazione genica specifica per un frammento dell'ORF L1 (450 bp) di HPV ha permesso di determinare la presenza di HPV-DNA nel 17,3% (53/306; IC95%: 13,5-22) delle giovani donne (età mediana 19 anni, range 19-21 anni), sessualmente attive, sottoposte a vaccinazione volontaria nel 18° anno d'età, con vaccino tetravalente anti-HPV ed inserite in uno studio presso l'Istituto Europeo di Oncologia di Milano (IEO). I campioni citologici sono stati raccolti dopo almeno un anno dalla chiusura della schedula vaccinale (Figura 47).

L'età mediana dei soggetti HPV infetti era di 19 anni.



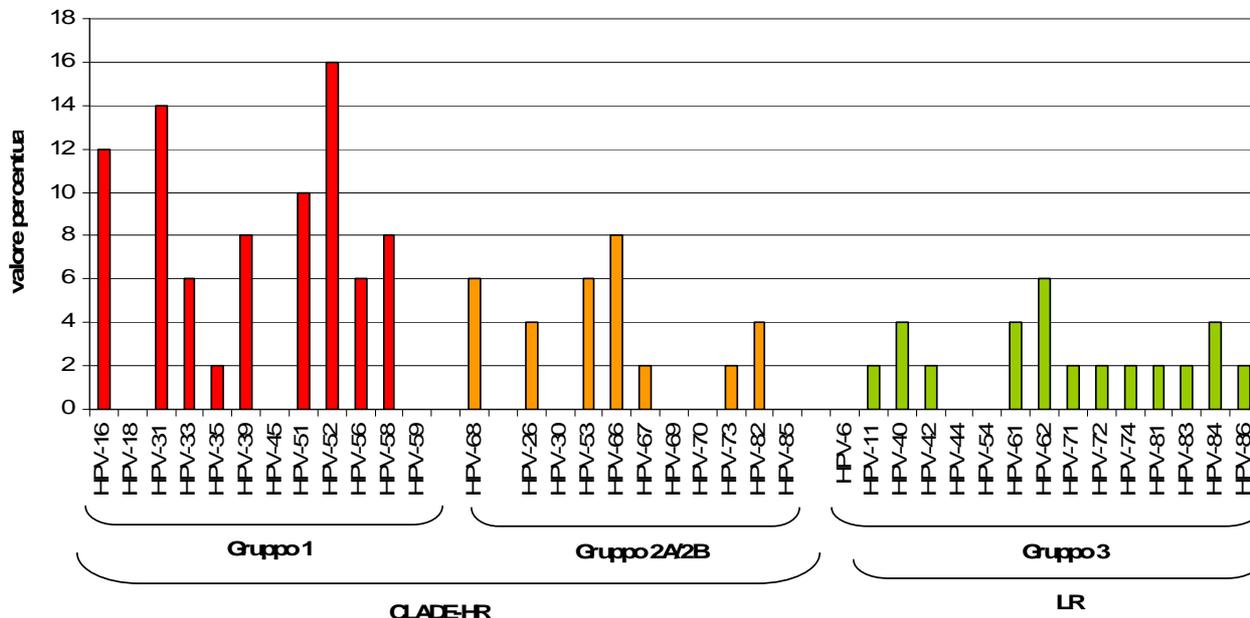
**Figura 47.** Prevalenza di infezione da HPV nelle adolescenti/giovani donne vaccinate con vaccino anti-HPV.

La successiva genotipizzazione mediante RFLP ha permesso di identificare i genotipi infettanti nel 94,3% (50/53) dei campioni HPV positivi. In 3/53 (5,6%) campioni la carica virale non era sufficiente per consentire la tipizzazione.

Nei campioni HPV-DNA positivi tipizzati è stato possibile identificare 28 diversi genotipi, di cui 16 (57,1%) inclusi nell'HR-clade, 9 nel Gruppo 1, 7 nel Gruppo 2A-2B, mentre 12 (42,9%) erano compresi nel Gruppo 3.

Tali genotipi erano presenti in 74 infezioni, 57 (77%) sostenute da genotipi dell'HR-clade e 17 (23%) da genotipi LR. Tra i genotipi HR, il più frequente era HPV-52 (16% dei soggetti HPV-DNA positivi), seguito da

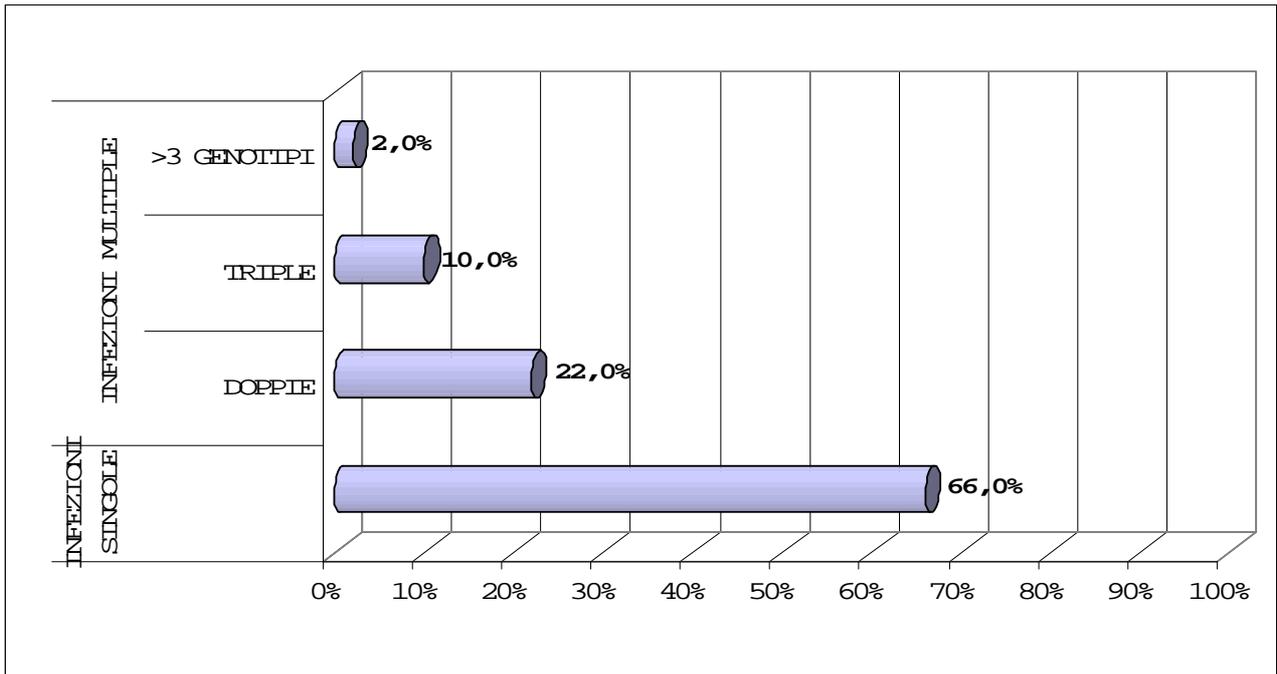
HPV-31 (14%), entrambi del Gruppo 1 (Figura 48). HPV-66 (Gruppo 2A-2B) era presente nell'8% delle giovani donne HPV positive, mentre tra i genotipi appartenenti al Gruppo 3 il prevalente era HPV-62 (6%).



**Figura 48.** Prevalenza dei genotipi di HPV rilevati nelle giovani donne vaccinate.

Nelle giovani donne vaccinate HPV positive, il 66% (33/50) presentava un'infezione da singolo genotipo, sostenute da genotipi dell'HR-clade nell'78,8% dei casi e da genotipi LR per il restante 21,2%.

Il restante 34% (17/50) presentava invece infezioni multiple, doppie nel 64,7%, triple nel 29,4% e per il 5,9% sostenute da >3 genotipi. L'11,8% (2/17) delle infezioni multiple erano sostenute da genotipi LR, mentre l'88,2% (15/17) da almeno un genotipo dell'HR-clade (Figura 49).

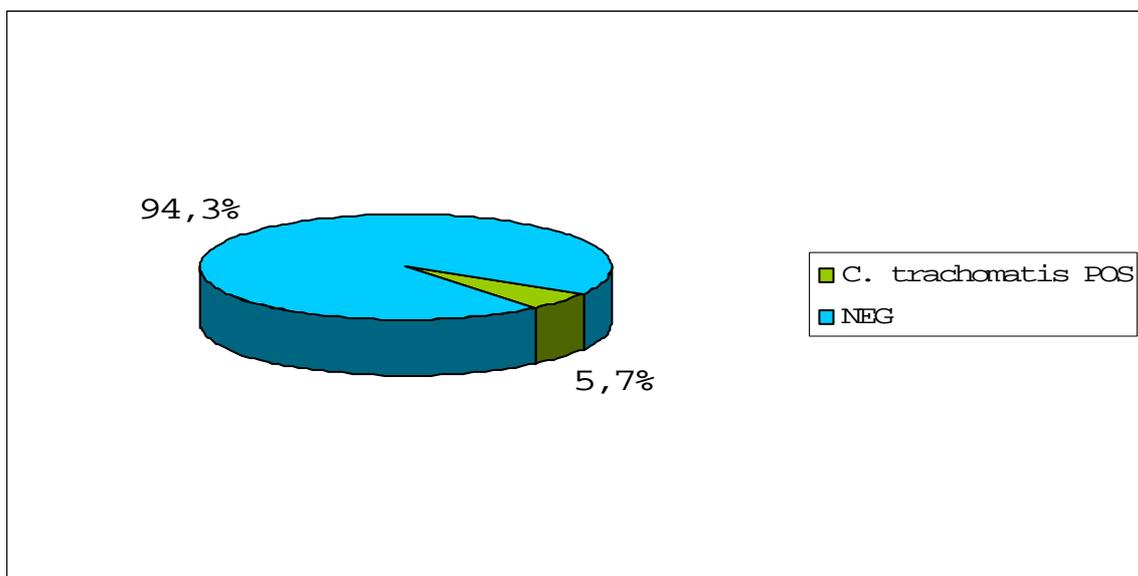


**Figura 49:** Frequenza delle infezioni singole e multiple nelle adolescenti/giovani donne vaccinate.

#### 4.1.4. PREVALENZA DI INFEZIONE DA *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* IN ADOLESCENTI/GIOVANI DONNE (13-24 ANNI) SESSUALMENTE ATTIVE

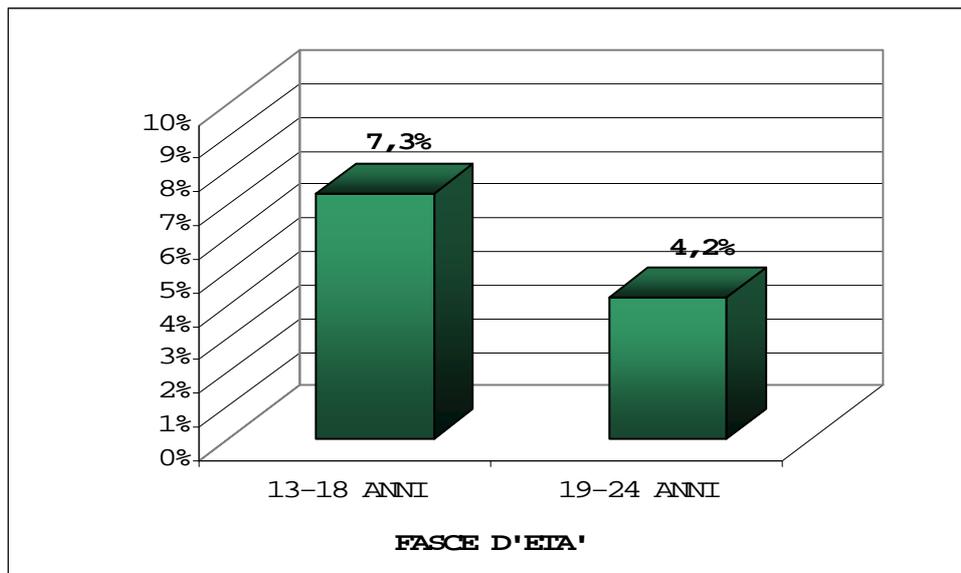
La presenza di infezione da *C. trachomatis* nella popolazione in studio è stata determinata tramite l'amplificazione di un frammento di 150 pb del plasmide criptico batterico.

La prevalenza di adolescenti/giovani donne con infezione da *C. trachomatis* è risultata pari al 5,7% (32/563; IC95%:4,0-8,0) (Figura 50). L'età media di tali soggetti era di 19,5 anni.



**Figura 50:** prevalenza di infezione da *Chlamydia trachomatis* in adolescenti/giovani sessualmente attive.

Considerando la suddivisione per età già utilizzata per la valutazione dell'infezione da HPV, nella I fascia d'età (13-18 anni) la prevalenza di infezione da *C. trachomatis* è risultata del 7,3% (20/274; IC95%:4,7-11,1), mentre era del 4,2% (12/289; IC95%:2,3-7,2) nella fascia 19-24 anni ( $p < 0,056$ ) (Figura 51).



**Figura 51.** Prevalenza delle infezioni da *C. trachomatis* nelle due fasce d'età considerate.

## **4.2. SORVEGLIANZA MICROBIOLOGICA DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA HPV E CHLAMYDIA TRACHOMATIS MEDIANTE ANALISI FILOGENETICA**

### **4.2.1. STUDIO DELLE VARIANTI GEOGRAFICHE E DEGLI EVENTUALI "ESCAPE MUTANTS" DEI GENOTIPI AD ALTO RISCHIO ONCOGENO HPV-16 E HPV-18 NELLA POPOLAZIONE GENERALE FEMMINILE (13-64 ANNI)**

Lo studio delle varianti geografiche e di eventuali "escape mutants" dei genotipi HPV-16 e HPV-18 a livello, rispettivamente, della regione regolatoria LCR e del gene codificante per la proteina L1 (costituente delle VLPs, utilizzate per l'allestimento dei vaccini) permette di condurre una sorveglianza virologica sulla circolazione e diffusione di varianti non Europee e sull'emergenza di mutanti potenzialmente in grado di eludere la risposta immunitaria indotta dal vaccino.

I campioni della popolazione in studio, riscontrati HPV-16 o HPV-18 positivi, sono stati pertanto sottoposti ad analisi filogenetica della regione regolatoria LCR (mediante sequenziamento di un frammento di 730 pb per HPV-16 e 1169 pb per HPV-18) e a caratterizzazione molecolare delle regioni di 1498 pb e 1488 pb del gene codificante per la proteina L1, contenenti gli epitopi immunodominanti.

Tra le 78 donne HPV infette della popolazione generale femminile di età 25-64 anni, 17 (21,8%) presentavano il genotipo HPV-16 e 4 (5,1%) il genotipo HPV-18.

Tra le 128 adolescenti/giovani donne HPV positive di età 13-24 anni, 24 (18,8%) erano infette da HPV-16 e 5 (3,9%) da genotipo HPV-18.

• ANALISI FILOGENETICA DELLA REGIONE LCR E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL GENE CODIFICANTE LA PROTEINA L1 DI HPV-16

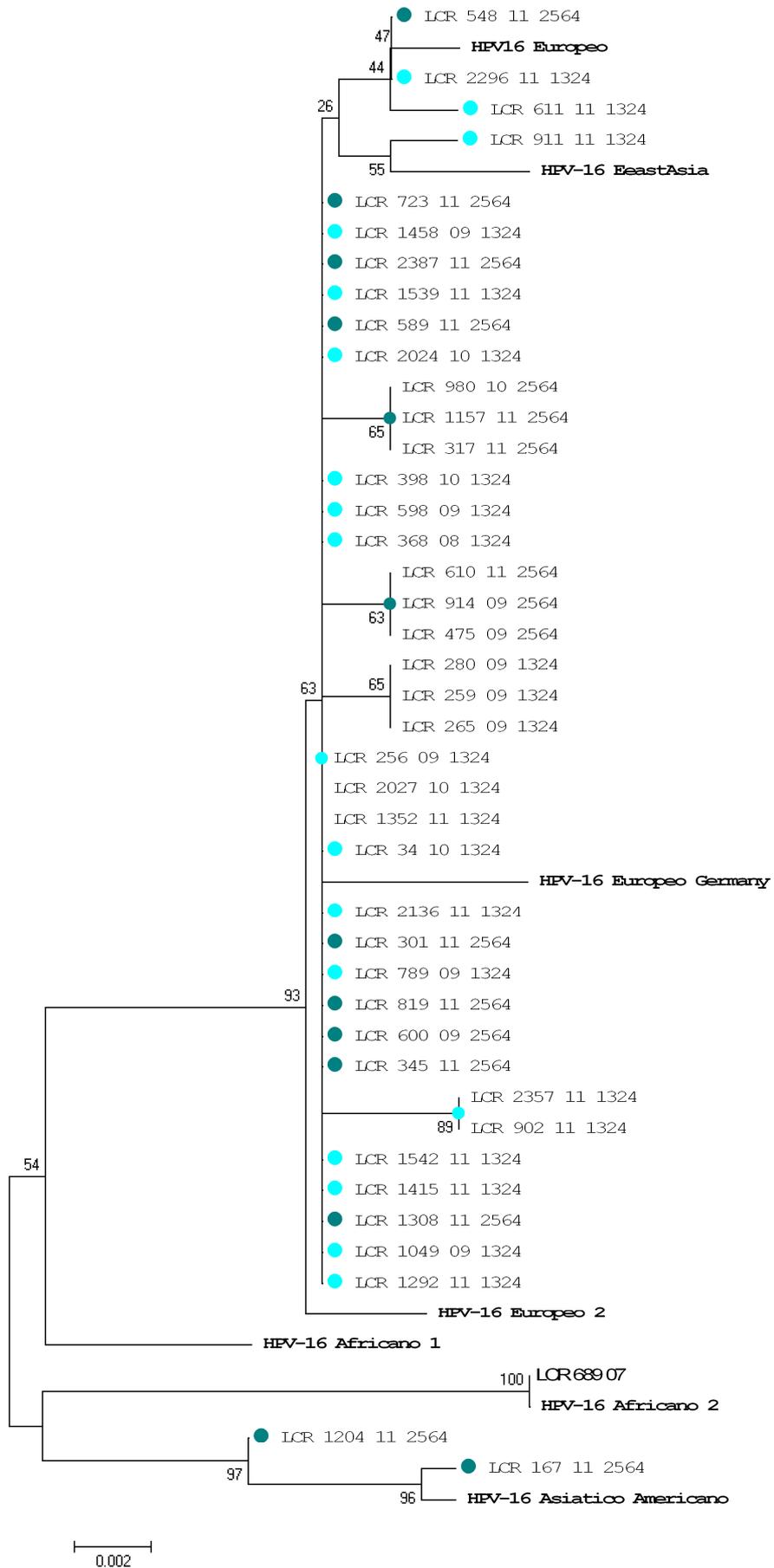
**Analisi filogenetica della regione regolatoria LCR di HPV-16**

L'analisi filogenetica della regione regolatoria LCR di HPV-16 è stata condotta su un frammento di 646 nucleotidi di ciascuno dei 41 campioni HPV-16 positivi.

Come si può osservare in Figura 52, il 95,1% (39/41) delle sequenze in studio apparteneva al *lineage* Europeo mostrando un'elevata similarità con la sequenza di riferimento (*range* 99,4%-99,7%); 2 sequenze (4,9%), LCR\_1204\_11 e LCR\_167\_11, appartenevano invece al *lineage* Asiatico-Americano con una similarità del 99,4% e del 99,7%, rispettivamente, con la sequenza di riferimento del *lineage*.

Entrambe le sequenze appartenenti al *lineage* Asiatico-Americano appartenevano a campioni prelevati alla coorte di donne di 25-64 anni di età.

**Figura 52:** Albero filogenetico costruito con le 41 sequenze in studio e le sequenze di riferimento della regione regolatoria LCR di HPV-16. Le sequenze ottenute dai campioni di donne della fascia d'età 13-24 anni sono evidenziate in azzurro mentre le sequenze ottenute dai campioni di donne appartenenti alla fascia d'età 25-64 anni sono evidenziate in verde.



- **Caratterizzazione molecolare del gene codificante per la proteina L1 di HPV-16**

La caratterizzazione molecolare della sequenza genica dell'ORF L1 di HPV-16 è stata condotta su un frammento di 1141 nucleotidi (nt 5731-nt 6871). Nelle 41 sequenze in studio sono state evidenziate 19 mutazioni nucleotidiche, di cui 8 (42,1%) sinonime e 11 (57,9%) non sinonime.

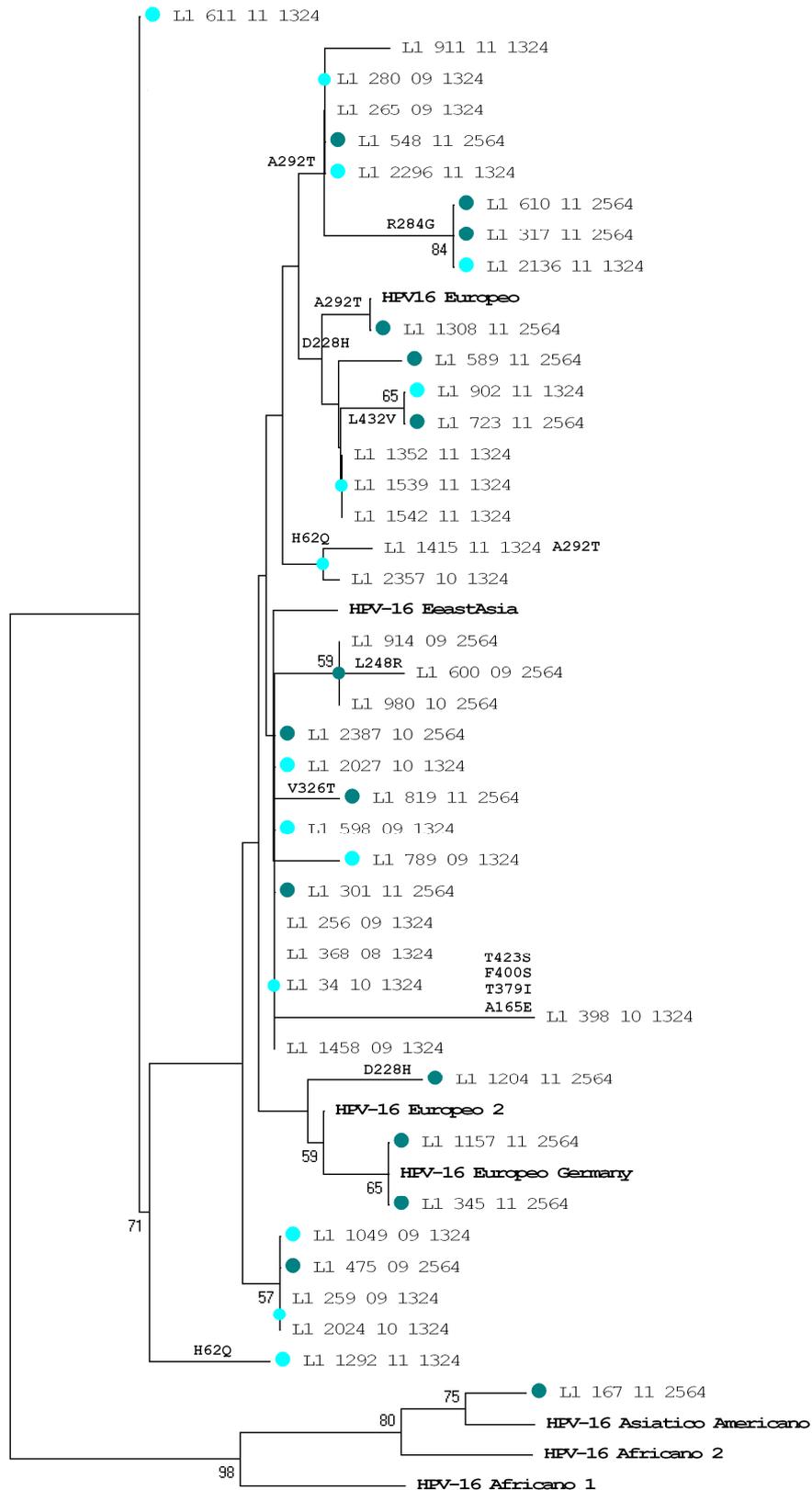
Tra queste ultime, 3 (27,3%) ricadevano all'interno di siti immunoepitopici: 1 nell'epitopo immunodominante DE (alanina 165 acido glutammico), 1 nell'epitopo FG (alanina 292 treonina) e una nell'epitopo HI (treonina 379 isoleucina). Nessuna mutazione ricadeva nel dominio  $\alpha$ -4, fondamentale per l'integrità conformazionale delle VLP (Figura 53).

In particolare, la mutazione presente al codone 292 da alanina a treonina (epitopo FG) caratterizzava 10 (24,4%) delle 41 sequenze in studio, mentre la mutazione D228H ne caratterizzava 8 (19,5%).

Le sequenze L1\_1415\_11 e L1\_2357\_10 erano caratterizzate dalla mutazione aminoacidica H62Q, mentre la mutazione R284G caratterizzava le sequenze L1\_610\_11, L1\_317\_11 e L1\_2136\_11.

Nessun evento di inserzione o delezione è stato identificato e non sono stati evidenziati codoni di stop prematuri.

**Figura 53:** Albero filogenetico costruito con le 41 sequenze in studio e le sequenze di riferimento del gene codificante per la proteina L1 di HPV-16. Sono evidenziate le principali mutazioni aminoacidiche riscontrate. Le sequenze ottenute dai campioni di donne della fascia d'età 13-24 anni sono evidenziate in azzurro mentre le sequenze ottenute dai campioni di donne appartenenti alla fascia d'età 25-64 anni sono evidenziate in verde.



0.001

Lo studio della pressione selettiva agente sulla sequenza genica dell'ORF L1 ha evidenziato pressione selettiva neutrale nelle sequenze in studio [ $d_N-d_S (\pm S.E.) = -0,007 (\pm 0.002)$ ].

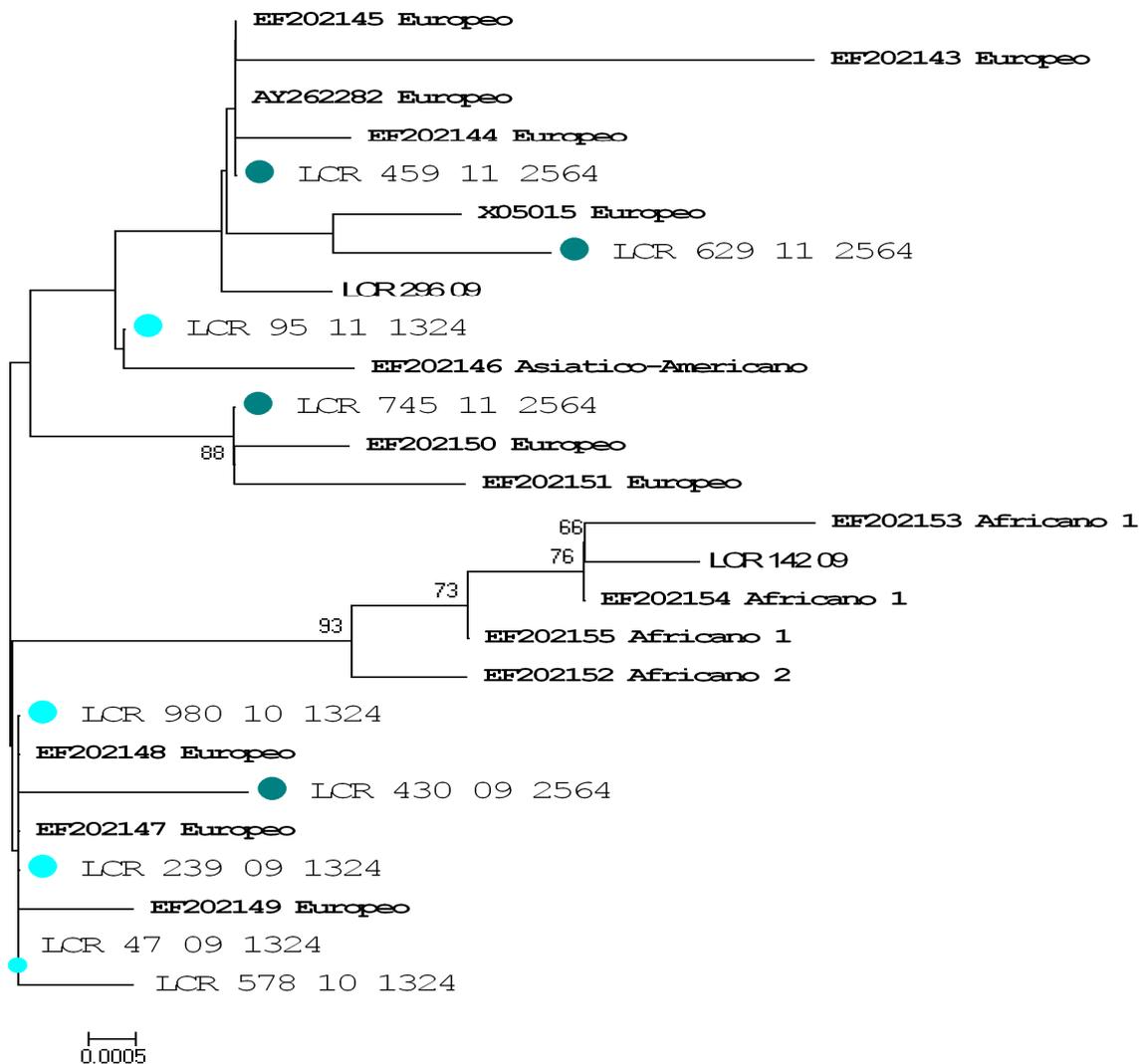
L'analisi integrativa per lo studio della pressione selettiva agente sui singoli codoni, condotta mediante utilizzo dei metodi SLAC (P-value=0.1), FEL (P-value=0.1) e REL (BF=50), ha identificato 12 codoni selezionati negativamente, rispettivamente in posizione: 117, 134, 141, 217, 252, 266, 277, 322, 333, 336, 387 e 434.

Nessun codone selezionato negativamente presentava mutazioni aminoacidiche, tuttavia il codone 141 rientrava nell'epitopo immunodominante DE.

- ANALISI FILOGENETICA DELLA REGIONE LCR E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL GENE CODIFICANTE LA PROTEINA L1 DI HPV-18

- Analisi filogenetica della regione regolatoria LCR di HPV-18

L'analisi filogenetica della regione regolatoria LCR di HPV-18 è stata condotta su un frammento di 680 nucleotidi proveniente da ciascuno dei 9 campioni HPV-18 positivi. Tutte le 9 sequenze in studio appartenevano al lineage Europeo, con elevata similarità con la sequenza di riferimento (range 99.5-100%)(Figura 54).



**Figura 54:** Albero filogenetico costruito con le 9 sequenze in studio e le sequenze di riferimento della regione regolatoria LCR di HPV-18. Le sequenze ottenute dai campioni di donne della fascia d'età 13-24 anni sono evidenziate in azzurro mentre le sequenze ottenute dai campioni di donne appartenenti alla fascia d'età 25-64 anni sono evidenziate in verde.

- **Caratterizzazione molecolare del gene codificante per la proteina L1 di HPV-18**

La caratterizzazione molecolare della sequenza genica dell'ORF L1 di HPV-18, condotta su un frammento di 1353 nucleotidi (nt 5679 - nt 7031), ha evidenziato 17 mutazioni nucleotidiche nelle 9 sequenze in studio rispetto alla sequenza di riferimento del *lineage* Europeo.

In particolare, 10 mutazioni erano sinonime e 7 non sinonime. Di queste ultime, 3 (42,9%) caratterizzavano altrettante sequenze in studio e ricadevano all'interno di siti epitopici.

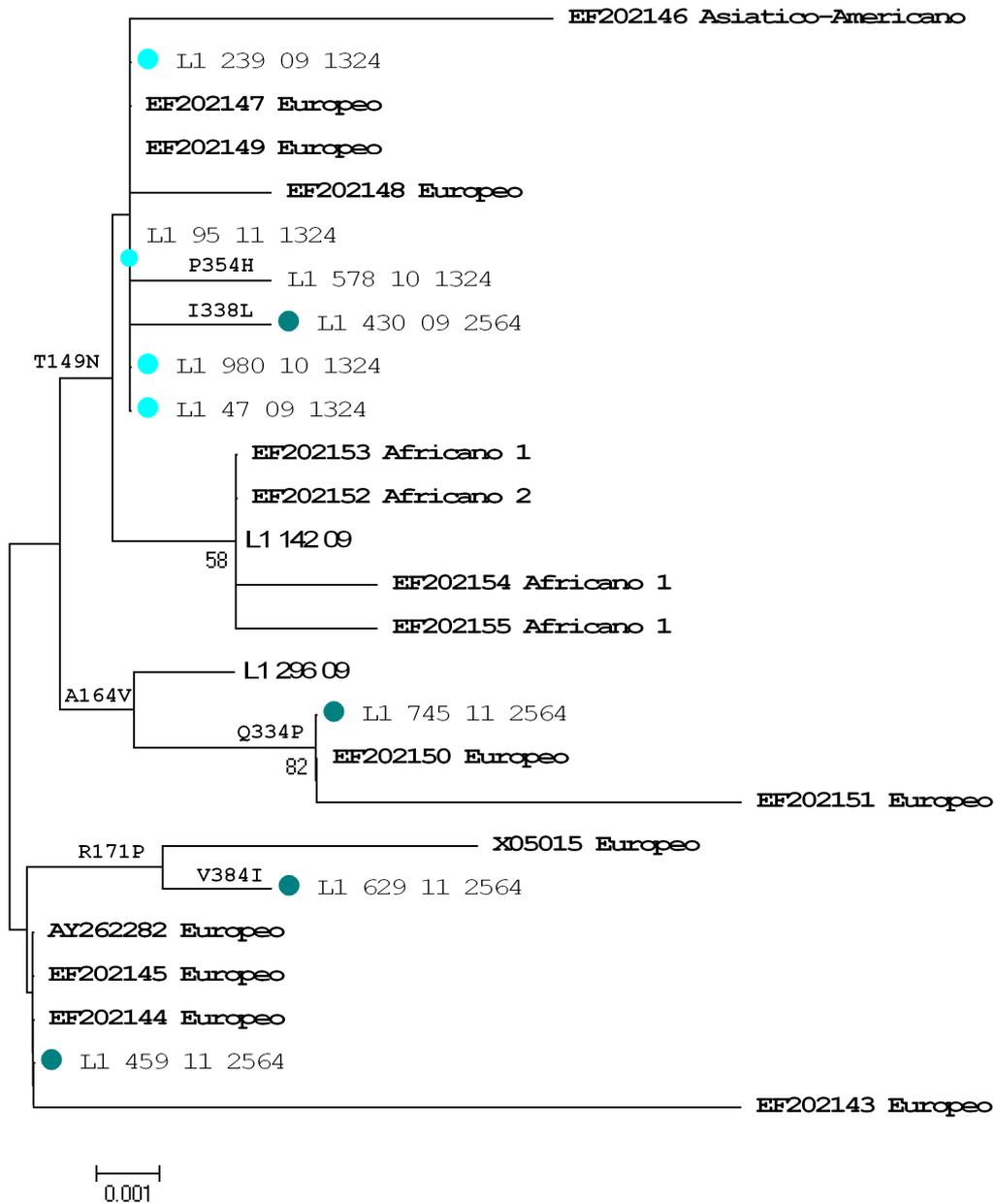
Più in dettaglio, le 2 mutazioni Q334P e I338L ricadevano nel sito immunoepitopico FG e caratterizzavano, rispettivamente, la sequenza L1\_745\_11 e L1\_430\_09. La sequenza L1\_629\_11 presentava invece la mutazione R171P nel sito epitopico DE. Le 3 sequenze appartenevano a virus sequenziati da campioni di donne della fascia d'età 25-64 anni.

La mutazione T149N caratterizzava il 66,7% delle sequenze in studio. Nessuna mutazione ricadeva nel dominio  $\alpha$ -4, fondamentale per l'integrità conformazionale delle VLP (Figura 55).

Nessun evento di inserzione o delezione è stato identificato e non sono stati evidenziati codoni di stop prematuri.

Lo studio della pressione selettiva agente sulla sequenza genica dell'ORF L1 ha evidenziato pressione selettiva neutrale nelle sequenze in studio [ $d_N-d_S$  ( $\pm$  S.E.) = -0,001 ( $\pm$  0,002)]. L'analisi integrativa per lo studio della pressione selettiva agente sui singoli codoni, condotta mediante l'utilizzo dei metodi SLAC (P-value=0.1), FEL (P-value=0.1) e REL (BF=50), ha identificato 6 codoni selezionati negativamente nelle posizioni: 97, 112, 135, 196, 218 e 252.

Nessun codone selezionato negativamente presentava mutazioni aminoacidiche, tuttavia il codone 112 rientrava nell'epitopo immunodominante BC e il codone 196 nell'epitopo DE.



**Figura 55:** Albero filogenetico costruito con le 9 sequenze in studio e le sequenze di riferimento del gene codificante per la proteina L1 di HPV-18. Sono evidenziate le principali mutazioni aminoacidiche riscontrate. Le sequenze ottenute dai campioni di donne della fascia d'età 13-24 anni sono evidenziate in azzurro mentre le sequenze ottenute dai campioni di donne appartenenti alla fascia d'età 25-64 anni sono evidenziate in verde.

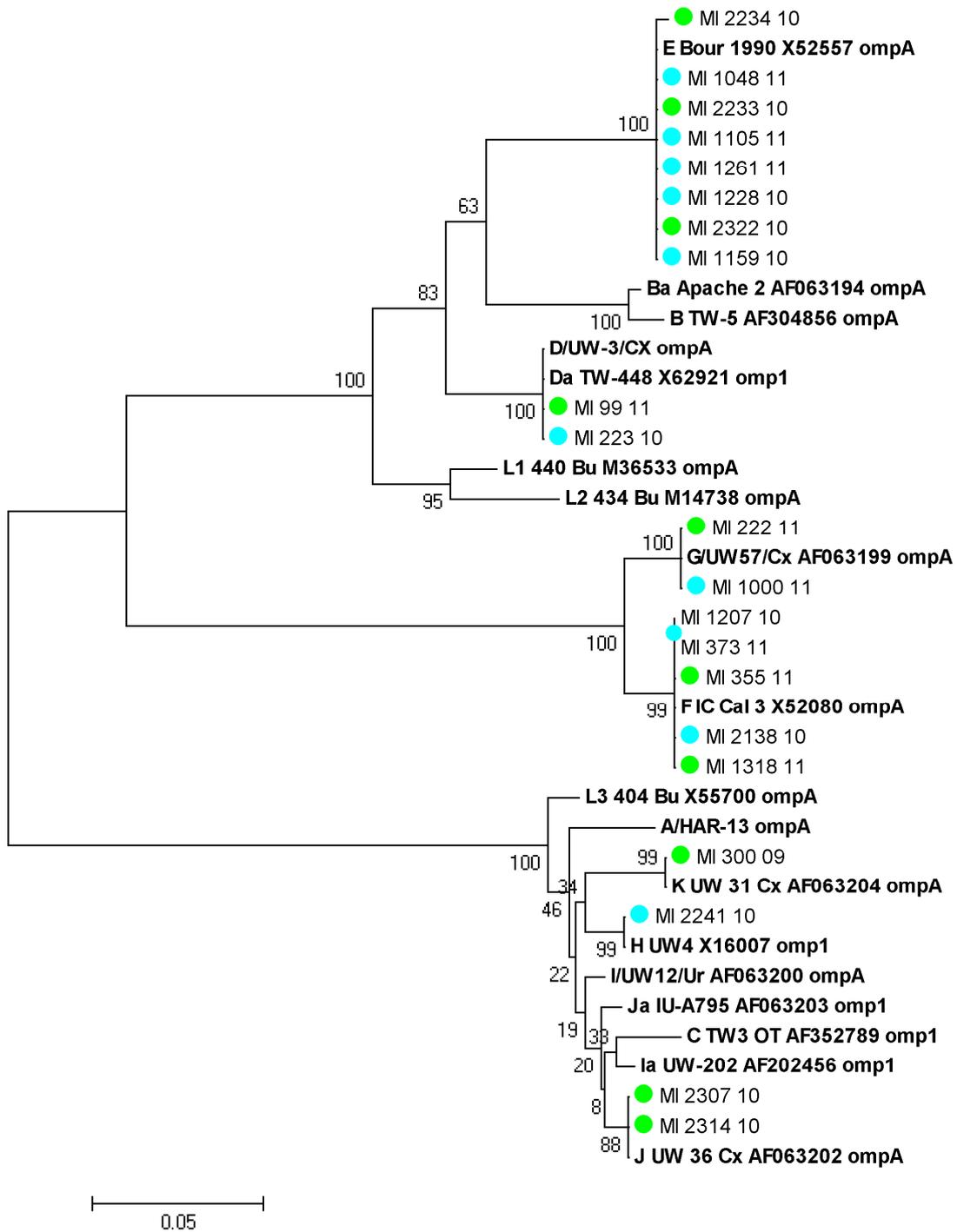
#### **4.2.2. VALUTAZIONE DEI PRINCIPALI SEROVAR DI *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* RESPONSABILI DI INFEZIONE NELLE ADOLESCENTI/GIOVANI DONNE (13-24 ANNI) SESSUALMENTE ATTIVE**

L'identificazione dei serovar di *Chlamydia trachomatis* circolanti nella popolazione è stata ottenuta tramite analisi filogenetica di un frammento di 304 pb, compreso tra il nucleotide 288 e il nucleotide 591, del gene *OmpA* codificante per la proteina maggiore di membrana (MOMP), di 1185 pb. L'analisi di sequenza è stata possibile per il 65,6% (21/32) dei campioni risultati positivi all'infezione da *C. trachomatis*.

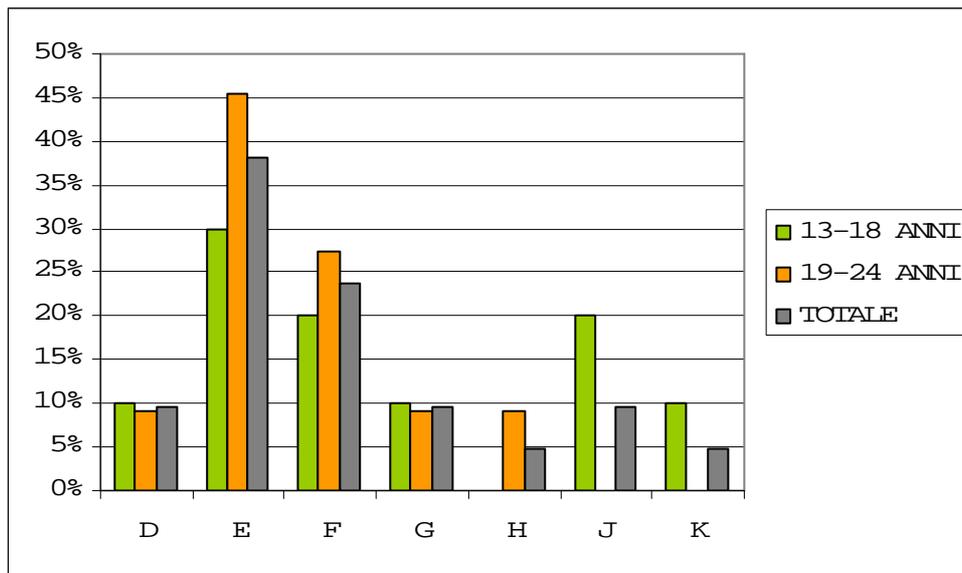
Come descritto in Figura 56 i serovar identificati erano 7, di cui 2 appartenenti al sierogruppo B (serovar D ed E), 2 al sierogruppo Intermedio (serovar F e G) e 3 appartenenti al sierogruppo C (serovar H, K e J). Tutti i serovar circolanti sono quelli in grado di causare infezioni nel tratto-urogenitale.

Complessivamente, il 47,6% (10/21) delle sequenze analizzate apparteneva al sierogruppo B e, tra queste, il 38,1% al serovar E e il 9,5% al D; il 33,3% delle sequenze era invece riconducibile al sierogruppo Intermedio (23,8% al serovar F e il 9,5% al G) ed il 19% al sierogruppo C (i serovar H e K caratterizzavano ciascuno il 4,8% dei campioni e il 9,5% apparteneva al serovar J).

In Figura 57 sono riportati i serovar circolanti nelle due fasce d'età considerate.



**Figura 56.** Albero filogenetico costruito su sequenze del gene *ompA* codificante per la proteina maggiore di membrana MOMP e principali serovar di *C. trachomatis* identificati nelle 21 sequenze batteriche in studio. In azzurro le sequenze batteriche identificate nella fascia d'età 13-18 anni; in verde le sequenze della fascia d'età 19-24 anni.



**Figura 57.** Prevalenza dei serovar di *Chlamydia trachomatis* circolanti nelle due fasce d'età considerate.

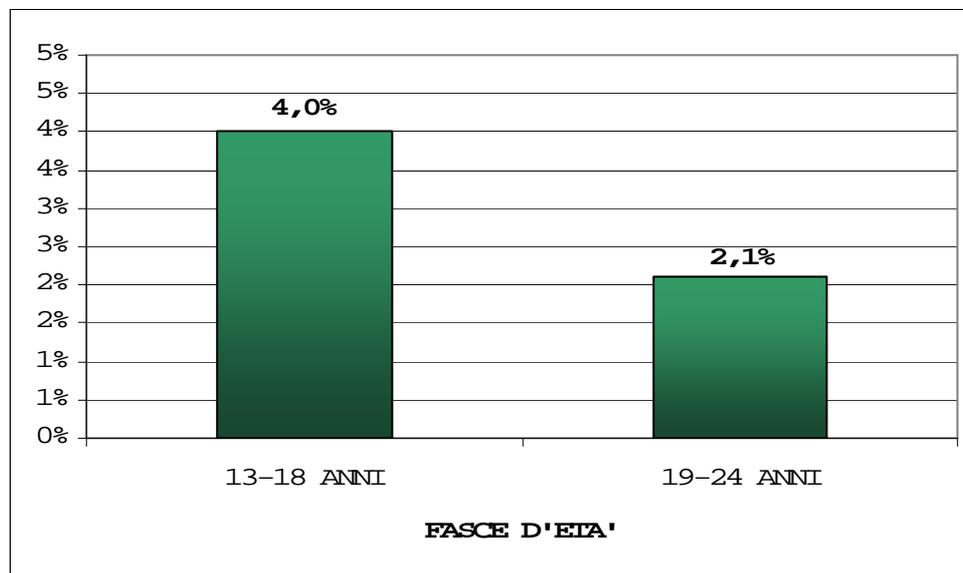
### **4.3. VALUTAZIONE DELLE CO-INFEZIONI HPV/CHLAMYDIA**

#### **TRACHOMATIS NELLE ADOLESCENTI/GIOVANI DONNE (13-24 ANNI)**

##### **SESSUALMENTE ATTIVE**

Il 3% (17/563, IC95%: 1,9-4, 8) dei soggetti in studio presentavano una co-infezione HPV - *Chlamydia trachomatis* (HPV-Ct). L'età media era di 19,2 anni (età mediana 18 anni).

La prevalenza di co-infezioni HPV-Ct in base all'età, è risultata del 4% (11/274) tra le 13-18enni e del 2,1% (6/289) tra le 19-24enni (Figura 58). Tale differenza non è risultata statisticamente significativa.

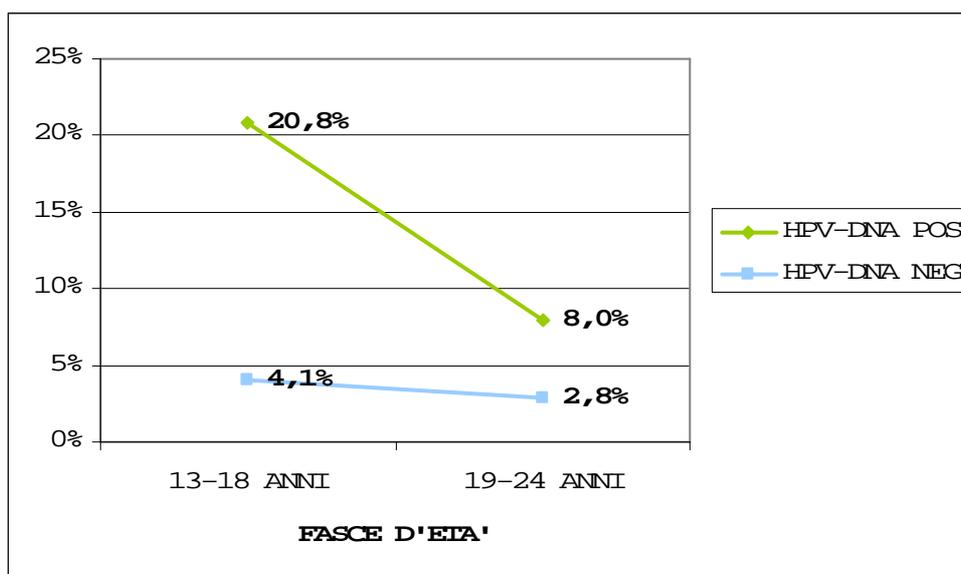


**Figura 58.** Prevalenza delle coinfezioni HPV / *C. trachomatis* nelle due fasce d'età considerate.

La prevalenza di infezione da *C. trachomatis* nei soggetti HPV-DNA positivi è risultata del 13,3% (17/128; IC95%:8,4-20,3), mentre nei soggetti HPV-DNA negativi era del 3,5% (15/435; IC95%:2,1-5,7). La differenza è risultata statisticamente significativa (Mid-P exact <0,00006).

Suddividendo per fascia d'età (Figura 59), le 13-18enni HPV-DNA positive mostravano una infezione da *C. trachomatis* nel 20,8% dei casi, mentre tale prevalenza era dell'8% tra le 19-24enni.

L'infezione da *C. trachomatis* nelle donne HPV negative è risultata invece del 4,1% e del 2,8%, rispettivamente, nelle 2 classi d'età.



**Figura 59.** Prevalenza di infezione da *C. trachomatis* in presenza/assenza di infezione da HPV.

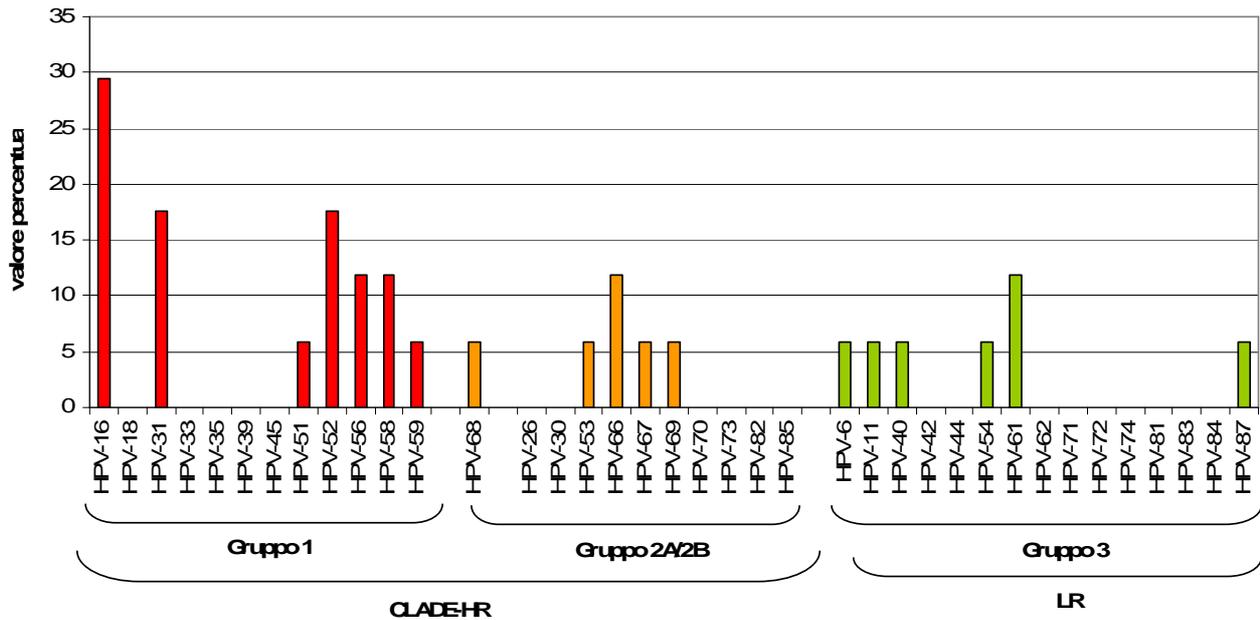
Nei 17 soggetti HPV / *C. trachomatis* coinfecti, le infezioni da HPV erano sostenute da 18 genotipi, di cui 12 dell'HR-clade (7 del Gruppo 1 e 5 del Gruppo 2A-2B) e 6 del Gruppo 3 (LR).

Delle 30 infezioni risultanti, il 76,7% era sostenuto da genotipi dell'HR-clade e il 23,3% da genotipi LR.

HPV-16 (29,4%) era il genotipo prevalente, seguito da HPV-31 e HPV-52 (17,6% ciascuno) (Figura 60).

I soggetti HPV/*C.a trachomatis* positivi mostravano, nel 58,9% dei casi infezioni singole, nel 41,1% multiple. Fra queste ultime, il 42,8% erano sostenute da 2, il 42,8% da 3 e nel 14,2% da >3 genotipi virali.

Le infezioni singole erano supportate per il 70% da genotipi dell'HR-clade, mentre per il 30% da genotipi LR. Solo un'infezione multipla era attribuibile a genotipi LR (14,3%), le altre erano sostenute da almeno 1 genotipo dell'HR-clade.



**Figura 60.** Prevalenza dei genotipi di HPV nei soggetti coinfecti con *C. trachomatis*.

Riguardo l'infezione da *C. trachomatis* la caratterizzazione molecolare del gene *ompA* è stata possibile su 14/17 (82,4%) campioni dei soggetti con co-infezione. Sono stati identificati 5 diversi serovar, di cui 2 appartenenti al sierogruppo B (serovar E e D), 2 al sierogruppo Intermedio (serovar F e G) e 1 al sierogruppo C (serovar J). I serovar E e F erano i prevalenti (rispettivamente nel 35,7% e nel 28,6%) seguiti dal serovar D e J (14,3% ciascuno) e dal serovar G (7,1% ciascuno).

## **5. CONCLUSIONI**

Le Infezioni Sessualmente Trasmesse (IST) costituiscono un vasto gruppo di patologie infettive ad ampia diffusione a livello mondiale, in grado di causare sintomatologie acute, infezioni croniche e severe complicanze a lungo termine per milioni di persone ogni anno, cui si associano ingenti costi per terapie e ricoveri.

Ad oggi si conoscono oltre 30 diversi quadri clinici associati a malattie a trasmissione sessuale, determinati da circa 20 agenti patogeni tra batteri, virus, miceti e protozoi [2,16].

Secondo le stime dell'OMS, le infezioni sessualmente trasmesse, escludendo l'AIDS, hanno un'incidenza annua di 448 milioni di casi e la loro diffusione ha ormai acquisito le caratteristiche di una pandemia [306].

Tali infezioni si trasmettono da un soggetto infetto ad uno suscettibile attraverso i rapporti sessuali. Si presentano spesso in forma asintomatica e, a seconda del patogeno implicato, possono portare ad esiti più o meno invalidanti. Ad esempio, l'infezione da *Chlamydia trachomatis* è associata al 30-40% dei casi di infertilità femminile, mentre alcuni genotipi di Papillomavirus umano (HPV) sono la causa eziologica necessaria per lo sviluppo del tumore della cervice uterina che, con oltre 500.000 nuovi casi/anno e circa 250.000 decessi/anno, è la seconda causa di tumore nelle donne a livello mondiale [307].

Il controllo e la prevenzione delle IST rappresentano quindi obiettivi prioritari dell'OMS e di altre organizzazioni sanitarie [2,16,18] proprio per le motivazioni sopra menzionate e, in particolare, per: (a) l'elevato numero di soggetti che ogni anno acquisisce una IST; (a) la proporzione rilevante di soggetti asintomatici, ma infetti e infettanti; (c) la maggiore diffusione in categorie, quali i giovani, con comportamenti sessuali a rischio; (d) l'elevata suscettibilità biologica di alcuni soggetti, come le giovani donne, caratterizzate da un apparato genitale istologicamente immaturo e quindi più favorevole ad infezioni e stabilizzazione dei patogeni; (e) le gravi sequele e complicanze in caso di mancata o errata diagnosi e/o trattamento, quali cronicizzazione, sterilità, trasformazione oncogena; (f) la possibilità di prevenire e curare efficacemente buona parte di queste.

Le strategie di prevenzione adottate riguardano prima di tutto la promozione di comportamenti sessuali responsabili, attuabile mediante informazione, attenzione nelle pratiche sessuali saltuarie e con partner occasionali, accesso all'uso di preservativi. L'educazione e il

*counselling* si dovrebbero accompagnare comunque a misure per l'identificazione precoce delle infezioni asintomatiche, nei confronti delle quali deve essere attuata un'adeguata terapia, sia per prevenire future sequele, sia per interrompere la catena di trasmissione.

Fra gli ostacoli che principalmente possono limitare l'attuazione delle strategie di prevenzione si sottolineano soprattutto la giovane età di acquisizione di molte di queste infezioni ed il decorso spesso asintomatico (almeno nelle prime fasi) o con quadri clinici aspecifici.

Le infezioni da HPV e *Chlamydia trachomatis* sono, tra le sessualmente trasmissibili, le più frequenti nella popolazione generale e condividono, oltre alla modalità di trasmissione, la precoce acquisizione, lo stato di asintomaticità nelle fasi più precoci e lo sviluppo di gravi sequele in età adulta.

Alla luce di queste premesse, il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivi principali quelli di studiare l'epidemiologia molecolare delle infezioni sostenute da HPV e *C. trachomatis* nella popolazione generale femminile sessualmente attiva e di valutare, mediante analisi filogenetica, le caratteristiche dei microrganismi circolanti.

I risultati ottenuti mostrano come la prevalenza di infezione da HPV nelle donne sessualmente attive di età 13-64 anni si attesti al 16,5%; in particolare, nelle adolescenti/giovani donne (età 13-24 anni) la prevalenza è risultata del 22,7%, mentre nelle donne di 25-64 anni era dell'11,3%.

In accordo con diversi studi epidemiologici [189, 308, 309], anche i nostri dati mostrano una diminuzione della prevalenza all'aumentare dell'età (26% nelle 19-24enni, 18,5% nelle 25-34enni, 6,9% nelle 35-44enni e 4,9% nelle 45-64enni) delle donne in studio.

La percentuale di positività dell'11,3% rilevata in **donne afferenti a screening spontaneo (25-64 anni)** è compresa tra quelle riportate in altri studi italiani [55, 189, 310-312] che, nella medesima fascia d'età, riscontrano prevalenze variabili dal 7,1% al 35,9%. Le diverse metodologie impiegate, ma anche differenze legate a situazioni geografiche e comportamentali, possono condurre a risultati non sempre sovrapponibili.

Le infezioni riscontrate erano sostenute da 28 diversi genotipi, la maggior parte dei quali appartenenti al *clade-HR* degli HPV riconosciuti come cancerogeni (gruppo I) o probabili/possibili cancerogeni (Gruppo 2A/2B) per l'uomo [62].

Su di un totale di 116 infezioni, oltre l'86% era attribuibile proprio a genotipi ad alto rischio oncogeno (HR), risultati prevalenti ( $p < 0,001$ ) rispetto ai genotipi a basso rischio (LR) in ogni fascia d'età in cui è stata suddivisa la popolazione analizzata.

In oltre 1/3 (38,6%) delle donne HPV-DNA positive le infezioni erano sostenute da più genotipi virali. Questo risultato è in accordo con i dati di letteratura, che riportano percentuali di infezioni multiple variabili dal 20% al 50% dei soggetti infetti [313]. Un ampio studio multicentrico italiano [189], condotto su oltre 9.900 donne afferenti a programmi di screening spontaneo, rileva il 22,2% di co-infezioni nelle HPV-DNA positive.

Relativamente alla frequenza dei 28 genotipi riscontrati nel nostro studio, HPV-16 (HR-Gruppo I) è risultato il prevalente (22,7% dei soggetti infetti), seguito da HPV-53 e da HPV-66 (entrambi HR-Gruppo 2A/2B, 16% ciascuno), HPV-31 (HR-Gruppo I, 14,7%) e HPV-52 (HR-Gruppo I, 10,7%).

Una meta-analisi [309] su donne HPV positive con citologia normale riporta i genotipi HPV-16, -18, -31, -58 e -52 come i più frequentemente riscontrati a livello mondiale. Tutti gli studi italiani citati in tale meta-analisi classificano HPV-16 come genotipo prevalente, seguito da HPV-58, -31, -66 e -53. I nostri dati quindi concordano, eccetto che per HPV-58 che, nella nostra casistica, risulta il genotipo HR meno frequentemente riscontrato.

Il 5% circa delle donne di 25-64 anni presentava un esito citologico anormale ( $\geq$  ASC-us) al Pap-test e, di queste, il 74% risultava infetto da HPV. L'analisi del genotipo ha permesso di evidenziare, nella maggioranza dei soggetti (71% circa), un'infezione singola sostenuta nel 91,7% dei casi da genotipi dell'*HR-clade* ( $p < 0,001$ ) e, tra questi, HPV-16 era il prevalente (58,3%). Ciò è in accordo con quanto rilevato in altri studi italiani [189, 310, 314] in donne con lesioni citologiche.

Nonostante gli adolescenti/giovani di 13-18 anni d'età rappresentino solo il 25% della popolazione sessualmente attiva, si stima che quasi il 50% dei casi di Infezioni Sessualmente Trasmesse si

verifichi in questa fascia di età [14]. Nel presente studio il 22,7% delle **adolescenti/giovani donne (13-24 anni)** è risultata infetta da HPV, mentre il 5,7% della stessa popolazione mostrava infezione da *C. trachomatis*.

Considerando la fascia d'età pediatrica (13-18 anni), il 19,3% dei soggetti è risultato HPV-DNA positivo. Alcuni studi [189, 315] riportano valori di prevalenza simili in adolescenti sessualmente attive di età comparabile, valori anche più elevati rispetto a quanto riscontrato nella popolazione femminile più adulta. Questa maggiore vulnerabilità riscontrata nelle adolescenti (e osservata anche per altre IST), viene spesso attribuita ad una maggiore esposizione a comportamenti potenzialmente a rischio. Un'altra possibile spiegazione è stata però recentemente individuata nella differente struttura organizzativa dell'epitelio cervicale che, nelle donne più giovani, sembra non aver ancora raggiunto la piena efficienza, relativamente sia al ruolo fisico di barriera sia alla risposta immuno-mucosale indotta [316].

La maggior parte delle infezioni, in questa fascia d'età, sono tuttavia di natura transitoria e regrediscono spontaneamente senza causare alterazioni citologiche. Tuttavia, una quota di tali infezioni non viene eliminata e la persistenza del virus nell'ospite è la potenziale causa dello sviluppo di lesioni intra-epiteliali di alto grado (HSIL) e di cancro invasivo in età adulta [315].

Nei soggetti di età superiore (19-24 anni), il dato di prevalenza è del 26%, in linea con quelli di letteratura (range di prevalenza: 19,7%-39%) [88, 317]. Recenti dati italiani, riportati da uno studio condotto in Toscana in 18-24enni, riportano una prevalenza di infezione simile (23,7%) [171], che cresce all'aumentare dell'età dei soggetti analizzati. Questo trend in ascesa è in linea con quanto riportato in altri Paesi industrializzati, dove il picco di infezione si osserva intorno ai 20-25 anni d'età [318].

Nello studio PreGio [189, 318], invece, la prevalenza nella fascia d'età 18-26 anni risulta del 18,7%, ma la differenza osservata è probabilmente imputabile ai metodi molecolari impiegati; nel citato studio è infatti stato utilizzato un metodo in grado di rilevare solamente le infezioni sostenute da 13 genotipi HR e non, come nel nostro lavoro, un test che riconosce tutti i genotipi HR ed anche gli LR.

Anche in questo caso, la diversa tipologia di coorte analizzata, ad esempio per presenza o assenza di particolari fattori di rischio o

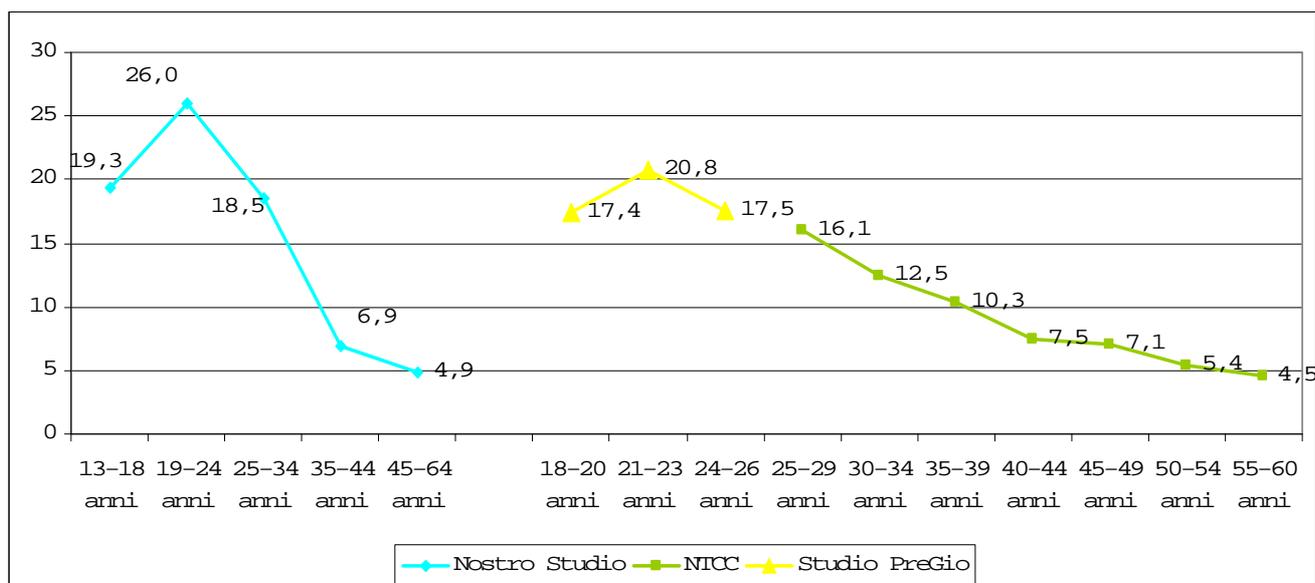
rispetto all'area geografica di provenienza, può influire sulle prevalenze di infezione osservate nei diversi studi. Nella nostra indagine sono state arruolate adolescenti/giovani donne residenti nel Nord Italia, sessualmente attive a partire dal 13° anno di età, esposte quindi al virus precocemente, e con diversi fattori di rischio di acquisizione delle IST.

Nelle adolescenti/giovani donne la genotipizzazione ha permesso di identificare 33 diversi genotipi, il 64% dei quali appartenente all'*HR-clade*. Anche in questa coorte, considerando sia il totale che le due fasce d'età in cui è stata suddivisa, i genotipi dell'*HR-clade* sono risultati significativamente prevalenti rispetto ai genotipi LR (75,3% vs 24,7%,  $p < 0,001$ ). Questo dato sottolinea come tale popolazione sia esposta principalmente ad HPV potenzialmente oncogeni.

La prevalenza e la numerosità delle infezioni nelle adolescenti/giovani adulte sono in linea con quanto riscontrato in altri Paesi industrializzati e risultano più elevate rispetto alla fascia d'età successiva (25-64 anni) [319].

Il genotipo più frequente è risultato, anche in questo caso, HPV-16, rilevato nel 20% delle infette, seguito da HPV-31 (13,3%), HPV-52 (12,5%) e HPV-56 (10%), tutti appartenenti al Gruppo 1 dell'*HR-clade*. HPV-6 (LR prevalente) è stato riscontrato nel 7,5% delle donne HPV infette.

I risultati ottenuti in questa prima parte del progetto di tesi ci permettono di concludere che la curva di prevalenza dell'infezione da HPV nella popolazione generale femminile (13-64 anni) sessualmente attiva da noi analizzata, è in linea, seppure con differenze dovute anche alla diversa suddivisione in fasce d'età, con quelle rilevate da altri due studi italiani [318, 320]. Ciò è descritto nella Figura sottostante.



Un rilevante aspetto della prevenzione dell'infezione da HPV è la disponibilità di vaccini specifici. La coorte di adolescenti/giovani donne qui considerata non era stata vaccinata contro HPV. È stato così possibile valutare empiricamente la quota di infezione potenzialmente prevenibile tramite vaccinazione, considerando la prevalenza dei genotipi inclusi nelle formulazioni vaccinali attualmente disponibili: HPV-16 e HPV-18, per il vaccino bivalente e, in aggiunta, HPV-6 e HPV-11 per il vaccino tetravalente.

I dati ottenuti hanno rilevato che la vaccinazione con vaccino bivalente avrebbe prevenuto il 16% delle infezioni riducendo del 2,3% la quota d'infezione nella popolazione. La somministrazione del vaccino tetravalente, invece, avrebbe prevenuto il 23,1% delle infezioni, riducendone la quota del 7,5%.

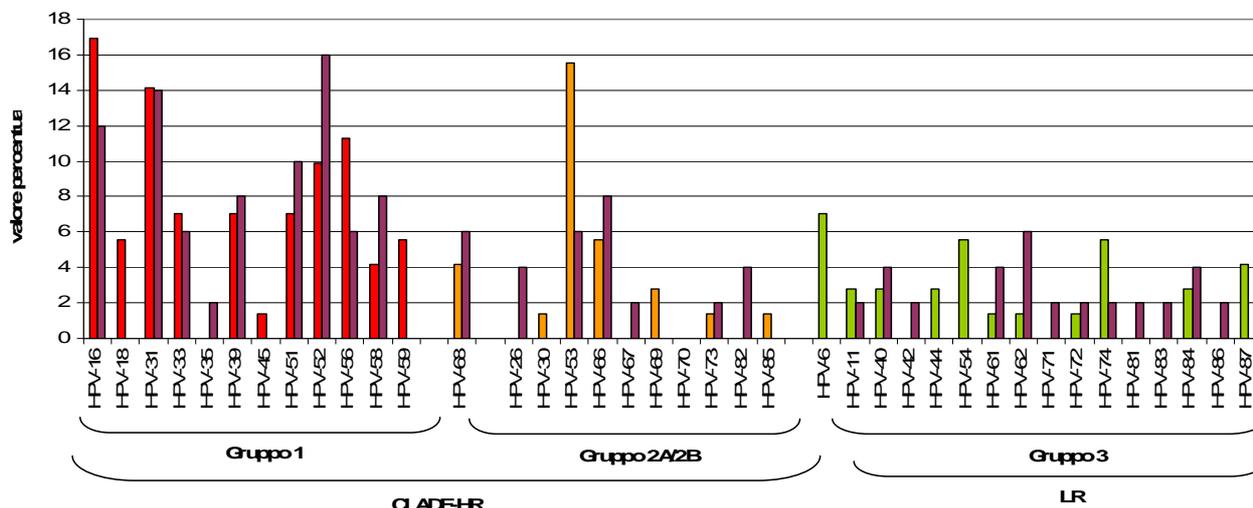
In considerazione poi del fenomeno di "cross-protezione" indotto dal vaccino nei confronti di genotipi appartenenti alle medesime specie dei genotipi HR vaccinali (HPV-16 vs HPV-31, -33, -52, -58, appartenenti alla specie 9 e HPV-18 vs HPV-45, appartenenti alla specie 7), la quota stimata di potenziale protezione sale all'11,7% con il vaccino bivalente e al 14% con il vaccino tetravalente.

Per valutare preliminarmente come la vaccinazione potesse influire sulla circolazione dell'HPV, abbiamo considerato una coorte di giovani donne arruolate nel 18°anno di età presso l'Istituto Europeo di Oncologia di Milano e sottoposte a profilassi vaccinale con vaccino tetravalente.

Questo studio prevedeva la raccolta di prelievi citologici al momento della prima dose di vaccino e, con cadenza annuale, per i cinque anni successivi di follow-up (18-23 anni).

La prevalenza di infezione da HPV osservata al prelievo effettuato ad almeno 1 anno dal completamento del ciclo vaccinale era del 17,3%, significativamente inferiore ( $p < 0,05$ ) rispetto alla comparabile popolazione della fascia d'età 19-24 anni (26%).

Il confronto tra coorte delle vaccinate e coorte delle giovani donne rileva una riduzione del numero totale di infezioni (74 vs 114), mentre rimangono pressoché costanti il numero di genotipi circolanti ed il rapporto fra genotipi dell'HR-clade e genotipi LR. In Figura sono riportati a confronto i genotipi rilevati nelle vaccinate (in viola) rispetto a quelli della coorte 19-24 anni.



Come è possibile osservare in Figura, il 12% delle donne vaccinate è risultato HPV-16 positivo ed il 2% HPV-11 positivo al controllo effettuato ad almeno 1 anno dalla conclusione del ciclo vaccinale. Questo dato non deve allarmare, in quanto tali soggetti vaccinati presentavano le medesime infezioni già al basale, cioè prima dell'inizio del ciclo vaccinale. Sarà comunque interessante seguire nel tempo questi soggetti per rilevare eventuali modificazioni sia dei genotipi HPV-16 e HPV-11 infettanti (a livello molecolare) sia della situazione clinica delle donne infette.

Nelle vaccinate non si sono evidenziate infezioni da HPV-45. Questa osservazione potrebbe deporre a favore della cross-protezione (specie 7 di HPV), mentre questo fenomeno non è stato rilevato per i genotipi appartenenti alla specie 9. Del resto, anche in letteratura pochi sono i

dati a favore della cross-protezione indotta dal vaccino tetravalente, mentre tale aspetto è stato maggiormente accertato per il vaccino bivalente [151, 152].

Nel prossimo futuro sarà possibile una valutazione più attendibile dell'efficacia della strategia vaccinale recentemente iniziata. Come si può intuire, tale efficacia può dipendere da diversi fattori, i principali dei quali sono riconducibili alle caratteristiche della popolazione vaccinata (esposta o meno ai genotipi vaccinali), ma anche all'eventuale pressione selettiva indotta dall'immunizzazione sui genotipi virali circolanti che potrebbe, potenzialmente, far emergere altri genotipi, al momento meno frequenti ("*type replacement*").

Oltre a ciò, si potrebbe osservare la maggiore diffusione di varianti geografiche non Europee (non utilizzate per la costituzione delle VLPs) dei genotipi contenuti nei vaccini o, sotto pressione immunitaria, di varianti in grado di evadere la risposta vaccinale (*escape mutant*) in quanto mutate a livello degli epitopi immunodominanti in essa coinvolti.

Diversi studi hanno dimostrato che le variazioni intratipiche di HPV-16 e HPV-18 possono essere rilevanti per la patogenicità e l'infettività virale [199, 321]. Queste variazioni possono influenzare la persistenza virale e la progressione a cancro invasivo che in parte spiega l'ampio spettro di patologie correlate all'infezione da HPV e gli elevati tassi di prevalenza del cancro cervicale in alcune Regioni/popolazioni rispetto ad altre.

Le mutazioni aminoacidiche risultanti da mutazioni delle sequenze geniche virali possono influenzare l'assemblamento virale, il potenziale cancerogeno del virus e la risposta immunitaria dell'ospite.

Tuttavia, non è ancora del tutto chiaro come la risposta immunitaria nei confronti di una variante di HPV possa proteggere contro l'infezione da altre varianti. Quindi, lo studio della diversità genetica in condizioni cliniche specifiche può risultare importante per un disegno razionale delle strategie diagnostiche, terapeutiche e vaccinali [322].

Queste varianti possono essere già presenti nella popolazione. Per questo motivo si è voluta valutare, in questo lavoro, la circolazione di varianti geografiche (LCR) e la presenza di mutazioni a livello degli epitopi della proteina L1 di HPV-16 e HPV-18.

Nello studio delle **varianti geografiche di HPV**, il sequenziamento e la successiva analisi filogenetica, condotta su 41 sequenze di HPV-16 e

su 9 sequenze di HPV-18, ha permesso di costruire per entrambi i genotipi il rispettivo albero filogenetico.

È stato così possibile osservare che il *lineage* circolante in oltre il 95% dei soggetti infetti da HPV-16 era l'Europeo, mentre 2 sequenze appartenevano al *lineage* Asiatico-Americano. Per HPV-18, invece, la totalità delle sequenze in studio apparteneva al *lineage* Europeo.

Delle 11 mutazioni aminoacidiche osservate nelle sequenze della **proteina L1** di HPV-16, il 27% circa cadeva all'interno dei *loop* immunodominanti (DE, FG e HI), epitopi coinvolti nell'interazione antigene-anticorpo che permette il riconoscimento e innesca la risposta immune dell'ospite. Per HPV-18, sono state rilevate in totale 7 mutazioni aminoacidiche, il 43% delle quali all'interno dei *loop* immunodominanti DE e FG.

L'analisi di sequenza non ha evidenziato selezione positiva per nessuna delle mutazioni presenti nei due genotipi analizzati, mentre è stata osservata selezione negativa per 12 codoni della proteina L1 di HPV-16, di cui 1 contenuto nell'epitopo DE, e per 6 codoni di HPV-18, di cui 1 contenuto in BC e 1 in DE. Questo basso tasso di cambiamento può essere attribuito al fatto che HPV utilizza il macchinario di replicazione della cellula ospite, caratterizzato da alta fedeltà, capacità di *proofreading* e meccanismi di correzione post-replicazione.

Inoltre, diverse funzioni codificate dalle proteine di HPV sono indispensabili per il ciclo vitale del virus stesso. Tali funzioni, tra cui la formazione della struttura capsidica, risultano in selezioni che limitano il numero di cambiamenti evolutivi possibili.

L'analisi della regione L1 ha permesso di identificare la presenza di diversi cambiamenti aminoacidici, il cui effettivo ruolo biologico resta ancora sconosciuto. Non è noto, infatti, come le mutazioni aminoacidiche possano influenzare la risposta immunitaria dell'ospite.

È stato riconosciuto che le variazioni intratipiche di HPV [199, 321] rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo del cancro e che queste mutazioni possono compromettere l'efficacia dell'infezione o l'antigenicità virale.

In previsione di un'applicazione a lungo termine del vaccino, si rende necessaria una sorveglianza virologica per poter cogliere potenziali variazioni nei virus circolanti nella popolazione ed, in particolare, l'emergenza di HPV-16 e HPV-18 *escape mutants* che, sfuggendo al controllo

della risposta immune indotta dalla vaccinazione, potrebbero inficiare l'efficacia di tale strategia di prevenzione.

Riguardo la seconda delle due IST qui considerate, dati di letteratura internazionali indicano come circa il 14% delle adolescenti che ricorrono a consultori mostrino un'**infezione da *Chlamydia trachomatis*** [323].

Il Ministero della Salute fornisce informazioni riguardo le MST a notifica obbligatoria, sifilide e gonorrea, anche se condizionati dal problema di sottotifica [324], mentre non sono disponibili dati sulla diffusione nazionale delle malattie non obbligatoriamente notificabili, tra cui quella da *C. trachomatis*.

E' però attivo in Italia un sistema di sorveglianza, affidato a 13 laboratori dislocati sul territorio nazionale, che ha valutato in uno studio pilota oltre 25.500 infezioni da *C. trachomatis* in donne con età mediana di 34 anni (range IQR = 29-39 anni). Il dato rilevato è riconducibile ad una prevalenza del 3% nelle donne con sintomatologia e dell'1,7% nelle asintomatiche [325].

Ad oggi mancano totalmente studi italiani di valutazione dell'infezione da *C. trachomatis* nella fascia d'età 15-25 anni, quella a maggior rischio di acquisizione e di evoluzione verso severe complicanze, soprattutto dal punto di vista riproduttivo.

Recenti dati europei hanno riportato una prevalenza variabile dal 5% al 15% in giovani donne appartenenti alla popolazione generale [323]. Uno studio condotto in 7 Paesi europei in donne asintomatiche di età 18-44 anni ha evidenziato prevalenze comprese tra 1,4% e 3%; altri dati ricavabili da sistemi di sorveglianza specifici per le IST si attestano su percentuali variabili dal 3,2% al 10,4% per questa infezione [326]; in Inghilterra, dove è attivo un programma di screening per le donne di età inferiore ai 25 anni, negli anni 2005-2006 la prevalenza di infezione da *C. trachomatis* è risultata del 10,1% [326, 327].

Il nostro studio si è focalizzato sulla popolazione considerata più a rischio per l'acquisizione delle IST (13-24 anni), rilevando il 5,7% di giovani donne infette da *C. trachomatis*, in un range compreso tra il 7,3% nella fascia 13-18 anni e il 4,2% nelle donne di 19-24 anni.

Lo spettro di patologie urogenitali causato da *C. trachomatis* comprende sia infezioni inapparenti, clinicamente asintomatiche, sia complesse sindromi clinicamente rilevabili.

La proteina maggiore di membrana (MOMP) di *C. trachomatis* contiene specifici antigeni che differenziano gli *strain* clamidiali in *serovar* (definizione basata sulla cross-reattività antigenica nei test di immunofluorescenza, mantenuta tale anche per l'analisi filogenetica). Ad oggi non esiste ancora una correlazione certa fra manifestazioni cliniche e specifici *serovar* per mancanza di studi numericamente rappresentativi. È noto comunque come i *serovar* maggiormente circolanti nella popolazione femminile con sintomatologia siano D, E, F, Ia e J, mentre tra le asintomatiche si riscontrano più frequentemente E ed F. Nella nostra popolazione sono stati identificati 7 *serovar*, con maggior circolazione di E ed F (38,1% e 23,8% rispettivamente) seguiti da G, D, J, K e H.

I nostri dati confermano quindi quanto riportato in letteratura internazionale [328-331] sulla maggiore diffusione (oltre il 50%) delle infezioni supportate dai *serovar* E ed F.

Il vantaggio biologico di questi due *serovar* risiede nella loro capacità di evadere, più facilmente rispetto agli altri, la risposta immunologica dell'ospite [332] e dalla presenza di particolari fattori di virulenza in grado di favorirne la trasmissione ed i processi infettivi. Queste valutazioni rendono ancora più significativi i dati ottenuti dal presente studio, principalmente perché sono, a nostra conoscenza, i primi dati italiani che riportano la circolazione dei diversi *serovar* clamidiali nella popolazione suscettibile.

Infine, un'importante considerazione riguardo le IST trattate in questo studio risiede nel fatto che, tra i fattori di rischio favorenti la persistenza di HPV nell'ospite con potenziale evoluzione verso la forma neoplastica, assume un ruolo rilevante la co-infezione con altri patogeni a trasmissione sessuale, in particolare *C. trachomatis*.

A livello cellulare, infatti, la presenza del battere può favorire la suscettibilità ad HPV, in quanto crea microabrasioni indispensabili per l'accesso del virus all'epitelio basale; inoltre, inducendo alterazioni nelle cellule epiteliali, facilita la persistenza dell'infezione. La co-infezione *C. trachomatis*/HPV può quindi limitare le possibilità di *clearance* dell'HPV condizionando la risposta immunitaria dell'ospite.

Nel nostro studio, il 3% delle giovani donne presentava co-infezione *C. trachomatis*/HPV. Analizzando i campioni *C. trachomatis* positivi in base a positività/negatività per HPV, si è notata una differenza statisticamente

significativa nella prevalenza di infezione da *C. trachomatis* tra i soggetti HPV-DNA positivi rispetto a quelli HPV-DNA negativi (13,2% vs 3,4%,  $p < 0,001$ ).

Non si sono osservate particolari associazioni fra genotipi di HPV ed infezione da *C. trachomatis*, tuttavia si trattava per la maggior parte di infezioni sostenute da genotipi appartenenti all'HR-clade (76,7%).

A conferma dei dati presenti in letteratura, anche i nostri risultati sembrano rilevare come l'infezione da *C. trachomatis* preceda quella da HPV (età mediana dei soggetti *C. trachomatis* positivi 19,5 anni vs età mediana dei soggetti HPV-DNA positivi 20 anni) e come la presenza di *C. trachomatis* possa favorire la precoce acquisizione di HPV (età mediana co-infetti 19,2 anni), anche se le differenze non sono significative.

I dati di prevalenza e di co-infezione delle due IST riscontrati in questa popolazione di adolescenti/giovani donne sottolineano la possibilità di considerare un intervento di prevenzione secondaria, lo screening, anche per l'infezione da *C. trachomatis*. Per quest'ultima infezione sembrerebbe tuttavia più indicato consigliarlo in età più precoce rispetto a quanto previsto per il Pap-test (età  $\geq 25$  anni), in modo da poter intervenire tempestivamente per la risoluzione dell'infezione con una terapia farmacologica mirata.

L'obiettivo di un programma di screening nei confronti di tale infezione risiederebbe nella riduzione della trasmissione del patogeno e nella limitazione della progressione clinica e, quindi, nella prevenzione delle sequele a lungo termine, rivolte anche alle criticità correlate alla co-infezione con HPV.

In conclusione, i risultati di questo progetto di ricerca forniscono nuove informazioni sulla diffusione delle due principali IST in adolescenti/giovani donne, valutando l'aspetto epidemiologico, finora poco noto, in una coorte spesso asintomatica e con riconosciuti comportamenti a rischio. Tali dati possono pertanto contribuire a meglio definire le due infezioni, base di partenza necessaria per la pianificazione di futuri interventi mirati di Sanità Pubblica.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

1. Díez M, Díaz A. *Sexually transmitted infections: epidemiology and control*. Rev Esp Sanid Penit 2011; 13(2): 58-66.
2. World Health Organization. *Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: Overview and estimates*. Geneva: WHO; 2010.
3. Randolph M, Foxman N, Foxman B. *Evolutionary approaches to sexually transmitted infections*. Ann N Y Acad Sci 2011; 1230: 1-3.
4. Ickovics JR, Niccolai LM, Lewis JB, et al. *High postpartum rates of sexually transmitted infections among teens: pregnancy as a window of opportunity for prevention*. Sex Transm Infect 2003; 79(6): 469-73.
5. Hitti J, Watts H. *Bacterial sexually transmitted infections in pregnancy*. In Holmes K, Sparling P, Stamm W, eds. *Sexually Transmitted Diseases*, 4th edn. McGraw-Hill, New York, 2008: 1529-61.
6. Borges-Costa J, Matos C, Pereira F. *Sexually transmitted infections in pregnant adolescents: prevalence and association with maternal and foetal morbidity*. J of the Eur Acad of Dermatol and Venereol 2011; doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04194.
7. Goldie SJ, O'Shea M, Díaz M, et al. *Benefits, cost requirements and cost-effectiveness of the HPV16,18 vaccine for cervical cancer prevention in developing countries: policy implications*. Reprod Health Matters 2008; 16(32): 86-96.
8. Centers for Disease Control and Prevention. *Sexually transmitted disease surveillance 2008*. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Service; 2008.
9. Lin JS, Whitlock E, O'Connor E, et al. *Behavioral counseling to prevent sexually transmitted infections: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force*. Ann Intern Med 2008; 149: 497-99.
10. Lowndes CM, Fenton KA, European Surveillance of STI's Network. *Surveillance systems for STI in the European Union: facing a changing epidemiology*. Sex Transm Infect 2004; 80(4): 264-71.
11. Low N, Broutet N, Adu-Sarkodie Y, et al. *Global control of sexually transmitted infections*. Lancet 2006; 368(9551): 2001-16.
12. Fenton K, Lowndes C. *Recent trends in the epidemiology of sexually transmitted infections in the European Union*. Sex Transm Infect 2004; 80(4): 255-63.
13. European Centre for Disease Prevention and Control. *Chlamydia control in Europe*. Stockholm, 2009. [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0906\\_GUI\\_Chlamydia\\_Control\\_in\\_Europe.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0906_GUI_Chlamydia_Control_in_Europe.pdf).
14. Weinstock H, Berman S, Cates WJr. *Sexually transmitted disease among American youth: Incidence and prevalence estimates, 2000*. Perspect Sex Reprod Health 2004; 36(1): 6-10.
15. Forhan S, Gottlieb S, Sternberg M, et al. *Prevalence of sexually transmitted infections among females adolescents aged 14 to 19 in the United State*. Pediatrics 2009; 124(6): 1505-12.
16. Centers for Disease Control and Prevention. *Sexually transmitted disease surveillance 2009*. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Service; 2010.
17. European Centre for Disease Prevention and Control. *Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010*. Stockholm: ECDC; 2010.
18. <http://www.epicentro.iss.it/infettive/>
19. Howley PM, Lowy DR. *Papillomaviruses and their replication*. In Fields: Knipe BN, Howley DM, Fields PM. *Virology*, 4a ed., Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001; 2197-29.
20. Lowy DR, Howley PM. *Papillomaviruses*. In Fields Knipe BN, Howley DM, Fields PM. *Virology*, 4a ed., Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001; 2231-64.
21. Bernard HU. *Coevolution of papillomaviruses with human population*. Trends Microbiol 1994; 2: 140-43.
22. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn T. *Genome variation of Human papillomavirus type: Phylogenetic and medical implication*. Int J Cancer 2006; 118: 1071-76.
23. Coggin J, zur Hausen H. *Workshop on papillomaviruses and cancer*. Cancer Res 1979; 39: 545-46.
24. Bernard HU. *The clinical importance of nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses*. J Clin Virology 2005; 32(S): S1-S6.
25. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. *Classification of papillomavirus*. Virology 2004; 324: 17-27.
26. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, et al. *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology 2010; 401(1): 70-79.
27. Feng Q, Kiviat NB. *Human Papillomavirus*. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*, 8a ed., ASM Press, Washington, 2003; 1512-23.
28. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. *Atomic model of the papillomavirus capsid*. EMBO J. 2002; 21: 4754-62.

29. Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J et al. *Epidemiological and clinical aspect of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer*. Rev Med Virol 2004; 14: 95-105.
30. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. *Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis*. J Virol 2004; 78(21): 11451-60.
31. Chong T, Apt D, Gloss B. *The enhancer of human papillomavirus type 16: Binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1 and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription*. J Virol 1991; 65: 5933-43.
32. Longworth MS, Laimins LA. *Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia*. Mic Mol Bio Rew 2004; 68(2): 362-72.
33. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. *HPV: from infection to cancer*. Biochem Soc Trans 2007; 35: 1456-60.
34. Evander M, Frazer IH, Payne E. *Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses*. J Virol 1997; 71: 2449-56.
35. Sibbet G, Romero-Graillet C, Meneguzzi G. *Alpha6 Integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4*. J Gen Virol 2000; 81: 327-34.
36. Lillo FB. *Il virus HPV: caratteristiche virologiche, ciclo replicativo, patogenesi e risposta immune*. STD news 2006; 26: 4-6.
37. Gilbert DM, Cohen SN. *Bovine papillomavirus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle*. Cell 1987; 50: 59-68.
38. Klumpp DJ, Laimins LA. *Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1*. Virology 1999; 257: 239-46.
39. Barksdale SK, Baker CC. *Differentiation-specific expression from the bovine papillomavirus type 1 P2443 and late promoters*. J Virol 1993; 67: 5605-16.
40. Dollard SC, Wilson JL, Demeter LM. *Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures*. Genes Dev 1992; 6: 1131-42.
41. Sailaja G, Watts RM, Bernard HU. *Many different papillomaviruses have low transcriptional activity in spite of strong epithelial specific enhancers*. J Gen Virol 1999; 80: 1715-24.
42. Spalholz BA, Lambert PF, Yee CL. *Bovine papillomavirus transcriptional regulation: localization of the E2-responsive elements of the long control region*. J Virol 1987; 61: 2128-37.
43. Thierry F, Howley PM. *Functional analysis of E2 mediated repression of the HPV-18 P105 promoter*. New Biologist 1991; 3: 90-100.
44. Mohr IJ, Clark R, Sun S. *Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator*. Science 1990; 250: 1694-99.
45. Baker CC, Howley PM. *Differential promoter utilization by the papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues*. EMBO J 1987; 6: 1027-35.
46. Kennedy IM, Haddow JK, Clements JB. *A negative regulatory element in the human papillomavirus type 16 genome acts at the level of late mRNA stability*. J Virol 1991; 65: 2093-97.
47. Koffa MD, Graham SV, Takagaki Y. *The human papillomavirus type 16 negative regulatory RNA element interacts with three proteins that act at different post-transcriptional levels*. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 4677-82.
48. Doobar J, Campbell D, Grand RA. *Identification of the human papillomavirus-1 a E4 gene products*. EMBO J 1986; 5: 355-62.
49. Doobar J, Ely S, Sterling J. *Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network*. Nature 1991; 352: 824-27.
50. Lillo FB, Lodini S, Ferrari D, et al. *Determination of human papillomavirus (HPV) load and type in high-grade cervical lesions surgically resected from HIV infected women during follow-up of HPV infection*. Clin Infect Dis 2005; 40(3): 451-57.
51. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM. *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53*. Cell 1990; 63: 1129-36.
52. Dyson N, Howley PM, Munger K. *The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product*. Science 1989; 243: 934-37.
53. Baseman JG, Koutsky LA. *The epidemiology of Human papillomavirus infections*. J of Clin Virol 2005; 32(S1): S16-S24.
54. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, et al. *Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia*. Vaccine 2008; 26(10): K1-16.
55. Ronco G. *Epidemiology of HPV genital infection and of its complications and use of HPV testing for cervical cancer screening*. Epidemiol Prev 2007; 31(2-3): 86-91.
56. Carozzi FM. *Biological basis for HPV vaccines*. Epidemiol Prev 2007; 31(2-3): 92-9.

57. Ho GYF, Burk RD, Klein S, et al. *Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia*. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 1365-71.
58. Koultsky LA, Holmes KK, Coticchio CW, et al. *A cohort study of the risk of cervical intra-epithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to Papillomavirus infection*. N Engl J Med 1992; 327: 1272-78.
59. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol 1999; 189(1): 12-9.
60. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, et al. *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet 2007; 370(9590): 890-907.
61. Nyitray A, Nielson CM, Harris RB, et al. *Prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus infection in heterosexual men*. J Infect Dis 2008; 197(12): 1676-84.
62. International Agency for Research on Cancer (IARC) working group. *Human papillomaviruses*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 100b, 2011; 261-319.
63. Schiffman M, Kjaer SK. *Chapter 2: natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia*. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003; 31: 14-9.
64. Gerberding J. *Report to Congress: Prevention of Genital Human Papillomavirus Infection Centers for Disease Control and Prevention*. Department of Health and Human Services, 2004.
65. Mahart LE, Koutsky LA. *Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis*. Sex Transm Dis 2002; 29: 725-35.
66. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, et al. *Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners*. N Engl J Med 2002; 346: 1105-12.
67. Winkelstein W Jr. *Smoking and cancer of the uterine cervix: hypothesis*. Am J Epidemiol 1977; 106: 257-59.
68. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, et al. *Identification of tobacco specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers*. J Natl Cancer Inst 1997; 89: 868-73.
69. Terai M, Burk RD. *Sexual behaviour and partner characteristics are the predominant risk factor for genital human papillomavirus infection in young women*. J Infect Dis 1996; 174(4): 679-89.
70. Palefsky JM, Holly EA, Efird JT, et al. *Anal intraepithelial neoplasia in the highly active antiretroviral therapy era among HIV-positive men who have sex with men*. AIDS 2005; 19: 1407-14.
71. Frazer IH. *Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship*. Virology 2009; 384(2): 410-4.
72. Stanley MA. *Immune responses to human papilloma viruses*. Indian J Med Res 2009; 130(3): 266-76.
73. Trerè D. *Le neoplasie, in Contran RS, Kumar V, Collins T, et al. Le basi patologiche delle malattie, 6a ed., Piccin, 2000, 299-382*.
74. Carozzi FM. *Combined analysis of HPV DNA and p16INK4a expression to predict prognosis in ASCUS and LSIL pap smears*. Coll Antropol 2007; 31(S): 103-6.
75. Feller L, Wood NH, Khammissa RA, et al. *Hpv modulation of host immune responses*. SADJ 2010; 65(6): 266-8.
76. Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, et al. *Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix*. Gynecol Oncol 2011; 121(1): 32-42.
77. Koerti V, Shah P, Howley MP. *Papillomaviruses*. Virology 1990; 165:1-76.
78. Brentjens MH, Yeung-Yue Ka, Lee PC, et al. *Human papillomavirus: a review*. Dermatol Clin 2002; 20: 315-31.
79. Muñoz N, Bosch FX, Castellsaguè X, et al. *Against which human papillomavirus types shall we vaccinate screen? The international perspective*. Int J Cancer 2004; 111: 278-85.
80. Boshart M, zur Hausen H. *Human papillomavirus (HPV) in Buscke-Lowenstein tumors: physical state and identification of a tandem duplication in the non-coding region of HPV-6 subtype*. J Virol 1986; 58: 963-66.
81. Lorincz AT, Temple GF, Patterson JA, et al. *Correlation of cellular atypia and human papillomavirus deoxyribonucleic acid sequences in exfoliated cells of the uterine cervix*. Obstet Gynecol 1986; 68: 508-12.
82. Forslund O, De Angelis PM, Beigi M, et al. *Identification of human papillomavirus in keratoacanthomas*. J Cutan Pathol 2003; 30(7): 423-29.
83. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, et al. *Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer*. Vaccine 2006; 24(S3): 42-51.
84. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. *The 2001 Bethesda System terminology for reporting results of cervical cytology*. JAMA 2002; 287: 2114-19.
85. Herrero R, Munoz N. *HPV and cancer*. Cancer Survey 1999; 33: 1-24.

86. Östör AG. *Natural history of cervical intraepithelial neoplasia, a critical review.* Int J Gynecol Pathol 1993; 12: 186-92.
87. Burchell AN, Coutlée F, Tellier PP, et al. *Genital transmission of human papillomavirus in recently formed heterosexual couples.* J Infect Dis 2011; 204(11): 1723-9.
88. Fredericks BD, Balkin A, Daniel HW, et al. *Transmission of human papillomaviruses from mother to child.* Aust N Z J Obstet Gynaecol 1993; 33(1): 30-32.
89. Stanley M. *Pathology and epidemiology of HPV infection in females.* Gynecol Oncol 2010; 117: S5-S10
90. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, et al. *Genital human papillomavirus infection: Incidence and risk factors in a cohort of female university students.* Am J Epidemiol 2003; 157: 218-26.
91. Syrianen S, Puranen M. *Human papillomavirus infection in children: the potential role of maternal transmission.* Crit Rev Oral Biol Med 2000; 11(2): 59-274.
92. Sinal SH, Woods CR. *Human papillomavirus infection of genital and respiratory tracts in young children.* Semin Pediatr Infect Dis 2005; 16(4): 306-16.
93. IARC (International Agency for Research on Cancer). *Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 64. Human papillomaviruses.* IARC. 1995; 35-378.
94. Parkin DM, Bray F. *Chapter 2: the burden of HPV-related cancers.* Vaccine 2006; 24(S3): 11-25.
95. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. *Global cancer statistic, 2002.* Ca Cancer J Clin 2005; 55: 74-108.
96. Boyle P, Leon ME, Maisonneuve P, et al. *Cancer control in women.* Int Gynecol Obstet 2003; 83: 179-202.
97. <http://www.who.int/hpvcentre/en/>
98. Arbyn M, Antilla A, Jordan J, et al. *European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening, second edition. Summary document.* Ann Oncol 2010; 21: 448-58.
99. AIRTUM Working Group. *Italian cancer figures - report 2006: incidence, mortality and estimates.* Epidemiol Prev 2006; 30(S2): 1-147.
100. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, et al. *Cancer incidence in five continents.* Lyon: IARC Scientific Publication 2002; N° 155.
101. AIRT working group. *I tumori in Italia-Rapporto 2006. Incidenza, mortalità e stime.* Epidemiologia e prevenzione 2006; 1S: 64-65.
102. Ronco G, Ghisetti V, Segnan N, et al. *Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy.* Eur J of Cancer 2005; 41: 297-305.
103. De Francesco MA, Gargiulo F, Schreiber C, et al. *Detection and genotyping of Human papillomavirus in cervical samples from Italian patients.* J Med Virol 2005; 75: 588-92.
104. Centurioni MG, Puppo A, Merlo DF, et al. *Prevalence of human papillomavirus cervical infection in an Italian asymptomatic population.* BMC Infect Dis 2005; 5: 77.
105. Salfa MC, Bocci C, Lillo F, et al. *Epidemiologia dell'infezione cervico-vaginale da Human Papillomavirus (HPV) in donne afferenti ad un programma organizzato per la prevenzione del cervicocarcinoma.* Abstract accettato alla IX Conferenza Nazionale di Sanità Pubblica. Parma 13-15 ottobre 2005.
106. Verteramo R, Pierangeli A, Calzolari E et al. *Direct Sequencing of HPV DNA detected in gynaecologic outpatients in Rome, Italy.* Microb Infect 2006; 8(9-10): 2517-21.
107. Carozzi F, Ronco G, Confortini M, et al. *Prediction of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in cytologically normal women by human papillomavirus testing.* Br J Cancer 2000; 83(11): 1462-67.
108. Smith JS, Lindsay L, Hoots B et al. *Human Papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update.* Int J Cancer 2007; 121: 621-32.
109. Clifford GM, Smith JS, Plummer M et al. *Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis.* Br J Cancer 2003; 88: 63-73.
110. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB et al. *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer.* Vaccine 2006; 24(S3): 1-10.
111. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S et al. *Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005b; 14: 1157-64.
112. Clifford GM, Gallus S, Herrero R et al. *IARC HPV Prevalence Surveys Study Group Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis.* Lancet 2005a; 336: 991-98.
113. de Sanjosè S, Diaz M, Castellsagué X et al. *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.

114. de Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2009; 124: 1626-36.
115. Tornesello ML, Duraturo ML, Botti G, et al. Prevalence of alpha-papillomavirus genotypes in squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma in the Italian population. *J Med Virol* 2006; 78(18): 1663-72.
116. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 2005; 24: 4-15.
117. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer* 2006; 119: 2677-84.
118. Kajaer SK, Svare EI, Worm AM, et al. Human papillomavirus infection in Danish female sex workers. Decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity. *Sex Transm Dis* 2000; 27(8): 438-45.
119. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005; 191: 1808-16.
120. Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiler C, et al. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res* 2007; 125(2): 176-82.
121. Crum CP. Apparato genitale femminile. In Contran RS, Kumar V, Collins T, et al. *Le basi patologiche delle malattie*, 6a ed., Piccin, 2000, p. 1209-68.
122. Schneider A, Koutsky L. Natural history and epidemiological features of genital HPV infection. *IARC Publ* 1992; 119: 25-52.
123. Morris BJ, Rose BR. Cervical screening in the 21st century: the case for human papillomavirus testing of self-collected specimens. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45(5): 577-91.
124. Schneider V, Henry MR, Jimenez-Ayala M, et al. Cervical cancer screening, screening errors and reporting. *Acta Cytol* 2001; 45(4): 493-8.
125. Nanda K, McCrocy DC, Myers ER, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000; 132: 810-19.
126. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology in primary screening of women younger than 35 years: results at recruitment for a randomised controller trial. *Lancet Oncol* 2006; 7: 547-55.
127. Lymaye A, Connor AJ, Huang X, Luff R. Comparative analysis of conventional Papanicolaou tests and a fluid-based thin-layer method. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 200-4.
128. Monsonogo J, Autillo-Touati A, Bergeron C, et al. Liquid-based cytology for primary cervical cancer screening: a multi-centre study. *Br J Cancer* 2001; 84: 360-66.
129. Carozzi F, Confortini M, Cecchini S, et al. HPV testing for cervical neoplasia. *Acta Cytol* 2001; 45: 659-61.
130. Hubbard RA. Human Papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 940-5.
131. Jenkins D. Diagnosis of human papillomaviruses: recent advances. *J Infect Dis* 2001; 14: 53-62.
132. Brennar M, Lambkin C, Sheehan D, et al. Detection of high-risk subtypes of human papillomavirus in cervical swabs: routine use of the Digene Hybrid Capture assay and polymerase chain reaction analysis. *Br J Biomed Sci* 2001; 58: 24-9.
133. Schiffman M, Adriaenza ME. ASCUS-LSIL Triage Study. Design, methods and characteristics of trial participants. *Acta Gytol* 2000; 44: 726-42.
134. Harwood CA, Spink PJ, Suretheran T, et al. Degenerate and nested PCR: A highly sensitive and specific method for detection of human papillomavirus infection in cutaneous warts. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3545-55.
135. Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, et al. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 1990; 71: 173-81.
136. Coutlè F, Rolueau D, Petignat P, et al. Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGMV primers and the linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1998-2006.
137. Park TC, Koh YM, Lee KH, et al. Human papillomavirus genotyping by the DNA chip in the cervical neoplasia. *DNA Cell Biol* 2004; 23(2): 119-25.
138. Tucker RA, Unger ER, Holloway BP, et al. Real-Time PCR-based fluorescent assay for quantitation of human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18. *Mol Diagn* 2001; 6: 39-47.
139. van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, et al. Human papillomavirus 16 load and abnormal cervical scrapes: an indicator of CINII/III and viral clearance. *Int J Cancer* 2002; 98: 250-59.

140. Schlecht NF, Duarte-Franco E, Rohan TE, et al. *Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia*. *Int J Cancer* 2003; 103(4): 519-24.
141. Stoler MH, Schiffman M. *Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study*. *JAMA* 2001; 285: 1500-5.
142. Lillo FB. *Utilità clinica dei test molecolari per l'HPV*. *STD news* 2006; 26: 7-9.
143. Sawaya GF, Brown AD, Whashington AE, et al. *Current approaches to cervical-cancer screening*. *N Engl J Med* 2001; 344: 1603-7.
144. Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, et al. *Clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity*. *J Pathol* 2003; 201(1): 1-6.
145. Manos MM, Kinney LB, Hurley LB, et al. *Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results*. *JAMA* 1999; 281: 1605-10.
146. Stanley M, Lowy DR, Frazer I. *Prophylactic vaccines: underlying mechanisms*. *Vaccine* 2006; 24: S106-S113.
147. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, et al. *Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12180-4.
148. Sasagawa T, Pushko P, Steers G, et al. *Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomavirus type 6 and type 16 in fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* 1995; 206: 126-135.
149. Markowitz LE, Dunne WF, Siraiya M, et al. *Quadrivalent Human papillomavirus Vaccine, Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices*. *MMWR* 2007; 56(RR-2): 1-24.
150. The FUTURE II Study Group. *Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent High-Grade Lesions*. *N Engl J Med* 2007; 356: 1915-27.
151. [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/hpv/en/](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/hpv/en/)
152. Harper DM, Franco EL, Wheller CM, et al. *Sustained efficacy up to 4.5 years of bivalent L1 virus-like particle vaccine against a human papillomavirus type 16 and 18: follow-up from a randomised trial*. *Lancet* 2006; 367: 1247-55.
153. Paavonem J, Halttunen M, Hansson BG, et al. *Prerequisites for human papillomavirus vaccine trial: results of feasibility studies*. *J Clin Virol* 2000; 19: 25-30.
154. Roden R, Armstrong A, Haderer P. *Characterization of a human papillomavirus variant-dependent neutralizing epitope*. *J Virol* 1997; 71: 6247-52.
155. Myers ER, McCrory DC, Nanda K, et al. *Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis*. *American J Epidemiol* 2000; 151(12): 1158-71.
156. Ferenczy A, Franco E. *Cervical-cancer screening beyond the year 2000*. *Lancet Oncol* 2001; 2: 27-32.
157. Papanicolaou GN, Traut HF. *The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus*. *Am J Obstet Gynecol* 1941; 42: 1941.
158. *Raccomandazioni per la pianificazione e l'esecuzione degli screening di popolazione per la prevenzione del cancro della mammella, del cancro della cervice uterine e del cancro del colon retto*. A cura dei Gruppi di Lavoro nominati dai Decreti del Ministro della Salute (3/11/2004 e 18/10/2005), in applicazione della L. 138/2004 (art. 2bis), Dipartimento Generale della Prevenzione, Ministero della Salute. Roma, 2006.
159. <http://www.gisci.it/>
160. Jemal AJ, Siegel R, Ward E, et al. *Cancer Statistics, 2007*. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66.
161. ACOG Practice Bulletin. *Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists: cervical cytology screening*. *Obstet Gynecol* 2003; 102: 417-27.
162. Davey E, Barratt A, Irwig L, et al. *Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review*. *Lancet* 2006; 367: 122-32.
163. Cuzick J. *Human Papillomavirus testing for primary cervical cancer screening*. *JAMA* 2000; 283: 108-109.
164. Davey D, Zarbo RJ. *Introduction and Commentary Papillomavirus Testing: Are you Ready for a New Era in Cervical Cancer Screening?* *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 927-29.
165. Kjaer S, Hogdall E, Frederiksen K, et al. *The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period*. *Cancer Res* 2006; 66: 10630-36.
166. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, et al. *Epidemiologic classification of human papillomavirus type associated with cervical cancer*. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.

167. Davies P, Arbyn M, Dillner J, et al. 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: 791-96.
168. Ratnam S, Franco EL, Ferenczy A. Human papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(9): 945-51.
169. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *Cancer J Clinic* 2002; 52(6): 342-62.
170. Bonanni P, Boccalini S, Bechini A. Efficacy, duration of immunity, and cross protection after HPV vaccination: a review of evidence. *Vaccine* 2009; 27: 46-53.
171. Confortini M, Carozzi F, Zappa M, et al. Human papillomavirus infection and risk factors in a cohort of Tuscan women aged 18-24: results at recruitment. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 157.
172. Lacey CJN. Therapy for genital human papillomavirus-related disease. *J Clin Virol* 2005; 32S: S82-S90.
173. Bacelieri R, Johnson SM. Cutaneous Warts: An Evidence-Based Approach to Therapy. *Am Fam Physician* 2005; 72: 647-52.
174. Rivera A, Tyring SK. Therapy of human papillomavirus of infections. *Dermatol Ther* 2004; 17(6): 441-8.
175. Mohanty KC, Lowe JM. Cryotherapy in the management of histologically diagnosed subclinical human papillomavirus (HPV) infection of the cervix. *Br Clin Pract* 1990; 44(12): 574-7.
176. Frega A, Di Renzi F, Palazzetti PL, et al. Laser CO2: results of treatment of HPV lesions in male the partner. *Minerva Ginecol* 1992; 44(6): 297-9.
177. Vanhootehem O, Richert B, de la Brassinne M. Raynaud phenomenon after treatment of verruca vulgaris of the sole with intralesional injection of bleomycin. *Pediatr Dermatol* 2001; 18: 249-51.
178. Beutner KR, Tyring S. Human papillomavirus and human disease. *Am J Med* 1997; 102: 9-15.
179. Snoeck R, Andrei G, De Clercq E. Cidofovir in the treatment of HPV-associated lesion. *Verh K Acad Geneesk Belg* 2001; 63(2): 93-120.
180. Sen E, McLaughlin-Drubin M, Meyers C. Efficacy of two commercial preparations of interferon-alpha on human papillomavirus replication. *Anticancer Res* 2005; 25(2A): 1091-100.
181. Richwald GA. Imiquimod. *Drugs Today (Barc)*. 1999; 35(7): 497-511.
182. Arias-Pulido H, Peyton CL, Torrez-Martínez N, et al. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. *Virology* 2005; 338(1): 22-34.
183. Ong CK, Chan SY, Campo MS, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 1993; 67: 6424-31.
184. Barbosa MS, Schlegel R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene* 1989; 4(12): 1529-32.
185. Romanczuk H, Villa LL, Schlegel R, et al. The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18. *J Virol* 1991; 65(5): 2739-44.
186. Villa LL, Schlegel R. Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. *Virology* 1991; 181(1): 374-7.
187. Rose B, Steger G, Dong XP, et al. Point mutations in SP1 motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity. *J Gen Virol* 1998; 79 (Pt 7): 1659-63.
188. Workshop PREGIO. La prevenzione dell'infezione da papilloma virus umano in Italia. *Rapporto ISTISAN* 2010; 10/25: 26-33
189. Agarossi A, Ferrazzi E, Parazzini F, et al. Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus infection in women undergoing voluntary cervical cancer screening in Italy. *J Med Virol* 2009; 81(3): 529-35.
190. Castellsague X, de Sanjose S, Aguado T, et al. HPV and cervical cancer in the World, 2007 report. *Vaccine* 2007; 25
191. Li N, Franceschi S, Clifford GM, et al. Human papilloma virus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 2011; 128(4): 927-35.
192. Deau M, Favre M, Jablonska S, et al. Genetic heterogeneity of oncogenic human papillomavirus type5 (HPV5) and phylogeny of HPV5 variants associated with epidermodysplasia verruciformis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2918-26.
193. Chen Z, Terai M, Fu L, et al. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol* 2005; 79: 7014-23.

194. Swan DC, Limor JR, Duncan KL, et al. *Human papillomavirus type 16 variant assignment by pyrosequencing*. *J Virol* 2006; 80(1): 166-70.
195. Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. *Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective*. *J Virol* 1997; 71: 2463-72.
196. Ho L, Chan SY, Burk RD, et al. *The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations*. *J Virol* 1993; 67: 6413-23.
197. Sichero L, Ferreira S, Trottier H, et al. *High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18*. *Int J Cancer* 2007; 120: 1763-68.
198. Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, et al. *Risk for High-Grade Intraepithelial Neoplasia Associated with Variants of Human papillomavirus Type 16 and 18*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(1): 4-10.
199. Hildesheim A, Shiffman MH, Bromley C, et al. *Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer*. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 315-18.
200. Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, et al. *Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study*. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1325-30.
201. Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, et al. *Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity*. *J Gen Virol* 2000; 81: 1975-81.
202. Ordonez RM, Espinosa AM, Sanchez-Gonzalez DJ, et al. *Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription*. *J gen Virol* 2004; 85: 1433-44.
203. Hubert WG. *Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle*. *J Virol* 2005; 79: 5914-22.
204. Choo KB, Wang TS, Huang CJ. *Analysis of relative binding affinity of E7-pRB of human papillomavirus 16 clinical variants using the yeast two-hybrid system*. *J Med Virol* 2000; 61: 298-302.
205. Yang R, Wheeler CM, Chen X, et al. *Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer*. *J Virol* 2005; 79: 6741-50.
206. Barbosa MS, Schlegel R. *The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes*. *Oncogene* 1989; 4(12): 1529-32.
207. Romanczuk H, Villa LL, Schlegel R, et al. *The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18*. *J Virol* 1991; 65(5): 2739-44.
208. Villa LL, Schlegel R. *Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region*. *Virology* 1991; 181(1): 374-7.
209. Rose B, Steger G, Dong XP, et al. *Point mutations in SP1 motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity*. *J Gen Virol*. 1998; 79 (Pt 7): 1659-63.
210. Carter JJ, Wipf GC, Benki SF, et al. *Identification of a Human Papillomavirus Type 16-Specific Epitope on the C-Terminal Arm on the major Capsid Protein L1*. *J Virol* 2003; 77: 11625-32.
211. Olcese VA, Chen Y, Schlegel R, et al. *Characterization of HPV-16 L1 domain in the formation of a type-specific, conformational epitope*. *BMC Microbiol* 2004; 4: 29-39.
212. Webb E, Cow J, and Edwards S. *Cervical Cancer-causing Human papillomaviruses have an Alternative Initiation Site for the L1 Protein*. *Virus Genes* 2005; 30(1): 31-5.
213. Wanerheit JN. *Chlamydial infections*. *Sex Transm Dis* 1990; 19: 61-77.
214. Bush RM, Everett KDE. *Molecular Evolution of the Chlamydiaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 203-20.
215. Charlotte A, Gaydo S, Palmer L, et al. *Phylogenetic Relationship of Chlamydia pneumoniae to Chlamydia psittaci and Chlamydia trachomatis as Determined by Analysis of 16S Ribosomal DNA Sequences*. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43: 610-12;
216. Batteiger BE. *The major outer membrane protein of a single Chlamydia trachomatis serovar can possess more than one serovar-specific epitope*. *Infection and Immunity* 1996; 64: 542-7.
217. Geisler WM, Suchland RJ, Whittington WL, et al. *The relationship of serovar to clinical manifestations of urogenital Chlamydia trachomatis infection*. *Sex Transm Dis* 2003; 30(2): 160-5.
218. van de Laar MJW, Lan J, van Duynhoven YTHP, et al. *Differences in clinical manifestations of genital chlamydial infections related to serovars*. *Genitourin Med* 1996; 72: 261-5.

219. van Duynhoven YT, Ossewaarde JM, Derksen-Nawrocki RP, et al. *Chlamydia trachomatis* genotypes: correlation with clinical manifestations of infection and patients' characteristics. *Clin Infect Dis* 1998; 26(2): 314-22.
220. Poli G, Cocuzza G, Nicoletti G, et al. *Chlamydiae*. In *Microbiologia Clinica*. 2° ed, UTET. 2002; 345-50.
221. Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1981; 31: 1161-76.
222. Caldwell HD, Judd RC. Structural analysis of chlamydial major outer membrane proteins. *Infect Immun* 1982; 38: 960-8.
223. Su H, Watkins NG, Zhang YX, et al. *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect Immun* 1990; 58: 1017-25.
224. Sun G, Pal S, Sarcon AK, et al. Structural and functional analyses of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 2007; 189: 6222-35.
225. Bavoil P, Ohlin A, Schachter J. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1984; 44: 479-85.
226. Hughes ES, Shaw KM, Ashley RH. Mutagenesis and functional reconstitution of chlamydial major outer membrane proteins: VS4 domains are not required for pore formation but modify channel function. *Infect Immun* 2001; 69: 1671-8.
227. Rodríguez-Marañón MJ, Bush RM, Peterson EM, et al. Prediction of the membrane-spanning beta-strands of the major outer membrane protein of *Chlamydia*. *Protein Sci* 2002; 11: 1854-61.
228. Wang Y, Berg EA, Feng X, et al. Identification of surface-exposed components of MOMP of *Chlamydia trachomatis* serovar F. *Protein Sci* 2006; 15: 122-34.
229. Baehr W, Zhang YX, Joseph T, et al. Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 4000-4.
230. Morrison RP, Manning DD, Caldwell HD. Immunology of *Chlamydia trachomatis* infections: immunoprotective and immunopathogenic responses. In Quinn TC ed. *Sexually transmitted diseases*. Raven Press, New York, NY. 1992; 57-84.
231. Zhang YX, Stewart S, Joseph T, et al. Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Immunol* 1987; 138: 575-81.
232. Zhang YX, Stewart SJ, Caldwell HD. Protective monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis* serovar- and serogroup-specific major outer membrane protein determinants. *Infect Immun* 1989; 57: 636-8.
233. Brunham RC, Zhang DJ, Yang X, et al. The potential for vaccine development against chlamydial infection and disease. *J Infect Dis* 2000; 181: 538-43.
234. de la Maza MA, de la Maza LM. A new computer model for estimating the impact of vaccination protocols and its application to the study of *Chlamydia trachomatis* genital infections. *Vaccine* 1995; 13: 119-27.
235. Fitch WM, Peterson EM, de la Maza LM. Phylogenetic analysis of the outer-membrane-protein genes of *Chlamydiae*, and its implication for vaccine development. *Mol Biol Evol* 1993; 10: 892-913.
236. Stephens RS. Chlamydial genomics and vaccine antigen discovery. *J Infect Dis* 2000; 181: 521-3.
237. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 1998; 282(5389): 754-9.
238. Carlson JH, Whitmire WM, Crane DD, et al. The *Chlamydia trachomatis* Plasmid Is a Transcriptional Regulator of Chromosomal Genes and a Virulence Factor. *Infection and Immunity* 2008; 2273-83.
239. Wyrick PB. Intracellular survival by *Chlamydia*. *Cell Microbiol* 2000; 2: 275-82.
240. Palmer L, Falkow S. A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 1986; 16(1): 52-62.
241. Thomson NR, Clarke IN. *Chlamydia trachomatis*: small genome, big challenges. *Future Microbiol* 2010; 5(4): 555-61.
242. Peterson EM, Markoff BA, Schachter J, et al. The 7,5-kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism. *Plasmid* 1990; 23: 144-8.
243. Thomas NS, Lusher M, Storey SS, et al. Plasmid diversity in *Chlamydia*. *Microbiol* 1997; 143: 1847-54.
244. Dautry-Varsat A, Balana ME, Wyplosz B. *Chlamydia*-host cell interactions: Recent advances on bacterial entry and intracellular development. *Traffic* 2004; 5: 561-70.

245. Engel JN. Azithromycin-induced block of elementary body formation in *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(10): 2304-9.
246. Morrè SA, van de Brule AJ, Rozendaal L, et al. The natural course of asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infections: 45% clearance and no development of clinical PID after one-years follow-up. *Int J STD AIDS* 2002; 13(S2): 12-18.
247. Mpiga P, Ravaoarinoro M. *Chlamydia trachomatis* persistence: An update. *Microbiol Res* 2006; 161: 9-19.
248. Fan T, Lu H, Hu H, et al. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: Blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J exp Med* 1998; 187: 487-96.
249. Lorenzato M, Clavel C, Masure M, et al. DNA image cytometry and human papillomavirus (HPV) detection help to select smears at high risk of high-grade cervical lesions. *J Pathol* 2001; 194: 171-6.
250. Melsheimer P, Klaes R, von Knebel-Doerberitz M, et al. Prospective clinical study comparing DNA flow cytometry and HPV typing as predictive tests for persistence and progression of CIN I/II. *Cytometry* 2001; 46: 166-71.
251. Prozialeck WC, Fay MJ, Lamar PC, et al. *Chlamydia trachomatis* disrupts N-cadherin-dependent cell-cell junctions and sequesters  $\beta$ -catenin in human cervical epithelial cells. *Infect Immun* 2002; 70: 2605-13.
252. Zhong G, Fan T, Liu L. *Chlamydia* inhibits interferon  $\gamma$ -inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J exp Med* 1999; 189: 1931-8.
253. Darville T, Hiltke JT. Pathogenesis of genital tract disease due to *Chlamydia trachomatis*. *JID* 2010; 201 (S2).
254. de la Torre E, Mulla MJ, Yu AG, et al. *Chlamydia trachomatis* infection modulates trophoblast cytokine/chemokine production. *J Immunol* 2009; 182(6):3735-45.
255. Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 1993; 61: 4569-74.
256. Hu VH, Harding-Esch EM, Burton MJ, et al. Epidemiology and control of trachoma: systematic review. *Trop Med Int Health* 2010; 15(6): 673-91.
257. Stevens-Simon C, Sheeder J. *Chlamydia trachomatis*: Common misperceptions and misunderstandings. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2005; 18: 231-43.
258. Haggerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, et al. Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. *J Infect Dis* 2010; 201 (S2): 134-55.
259. Cates W, Jr., Wasserheit JN. Genital chlamydial infections: Epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1771-1781.
260. Cunningham KA, Beagley KW. Male genital tract chlamydial infection: Implications for pathology and infertility. *Biol Reprod* 2008; 79: 180-9.
261. Gonzales GF, Munoz G, Sanchez R, et al. Update on the impact of *Chlamydia trachomatis* infection on male fertility. *Andrologia* 2004; 36: 1-23.
262. Mabey D, Peeling RW. *Lymphogranuloma venereum*. *Sex Transm Infect* 2002; 78: 90-2.
263. Christerson L, de Vries HJ, de Barbeyrac B, et al. Typing of lymphogranuloma venereum *Chlamydia trachomatis* strains. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(11): 1777-9.
264. Pereira SMM, Etilinger D, Aguiar LS, et al. Simultaneous *Chlamydia trachomatis* and HPV infection in Pregnant women. *Diagn Cytopat* 2010; 38: 397-401.
265. Holmes KK, Levine R, Weaver M. Effectiveness of condoms in preventing sexually transmitted infections. *Bull World Health Organ* 2004; 82(6): 454-61.
266. Low N, Cassell JA, Spencer B, et al. *Chlamydia* control activities in Europe: cross-sectional survey. *Eur J Public Health*. 2011.
267. Whitehead SJ, Leelawiwat W, Jeeyapant S, et al. Increase in sexual risk behavior and prevalence of *Chlamydia trachomatis* among adolescents in Northern Thailand. *Sex Transm Dis* 2008; 35(10): 883-8.
268. Bhalla P, Chawla R, Garg S, et al. Prevalence of bacterial vaginosis among women in Delhi, India. *Indian J Med Res* 2007; 125(2): 167-72.
269. Suarkia DL, Mgone CS, Lehmann D, et al. *Chlamydia trachomatis* infection and distribution of serovars in the Eastern Highlands Province, Papua New Guinea. *PNG Med J* 2007; 50(3-4): 134-44.
270. Machado AC, Bandea CI, Alves MF, et al. Distribution of *Chlamydia trachomatis* genovars among youths and adults in Brazil. *J Med Microbiol* 2011; 60(Pt 4): 472-6.
271. Huneeus A, Pumarino MG, Schilling A, et al. Rates of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Chilean adolescents. *Rev Med Chil* 2009; 137(12): 1569-74.
272. Low N. Screening programs for chlamydial infection: When will we ever learn? *BMJ* 2007; 334(7596): 725-8.
273. Latino MA, Bello L, Lanza A, et al. *Chlamydia trachomatis* infection among sexually active young women in Italy. *Sex Transm Infect* 2002; 78.

274. Black CM. *Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections*. Clin Microbiol Rev 1997; 10(1): 160-84.
275. Kuo CC, Wang SP, Grayston JT. *Growth of trachoma organism in HeLa 229 cell culture*. In Hobson D, Holmes KK (ed.). *Nongonococcal urethritis and related infections*. American Society for Microbiology, Washington DC. 1977; 328-336.
276. Khan ER, Hossain MA, Paul SK, et al. *Molecular diagnosis of genital Chlamydia trachomatis infection by polymerase chain reaction*. Mymensingh Med J 2011; 20(3): 362-5.
277. Brunham RC, Peeling RW. *Chlamydia trachomatis antigens: role in immunity and pathogenesis*. Infect Agents Dis 1994; 3: 218-33.
278. Grayston JT, Woolridge RL, Wang SP, et al. *Field studies of protection from infection by experimental trachoma virus vaccine in preschool-aged children on Taiwan*. Proc Soc Exp Biol Med 1963; 112: 589-95.
279. Dhir SP, Agarwal LP, Detels R, et al. *Field trial of two bivalent trachoma vaccines in children of Punjab Indian villages*. Am J Ophthalmol 1967; 63(5): 1639-44.
280. Grayston JT, Wang SP. *The potential for vaccine against infection of the genital tract with Chlamydia trachomatis*. Sex Transm Dis 1978; 5: 73-7.
281. Rank RG. *Models of immunity*. In *Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis and Immunity*. Edited by RS Stephens, Washington DC: American Society for Microbiology 1999; 239-295.
282. Zhang DJ, Yang X, Berry J. *DNA vaccination with the outer membrane protein gene induces acquired immunity to Chlamydia trachomatis (mouse pneumocitis) infection*. J Infect Dis 1997; 176: 1035-40.
283. Lau C, Qureshi A. *Azithromycin versus doxycycline for genital chlamydial infections: A meta-analysis of randomized clinical trials*. Sex Transm Dis 2002; 29(9): 497-502.
284. Puranen M, Saarikoski S, Syrjänen K, et al. *Polymerase chain reaction amplification of human papillomavirus DNA from archival, Papanicolaou-stained cervical smears*. Acta Cytol 1996; 40(3): 391-5.
285. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. *Identification and assessment of known and novel length polymorphism, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms*. J Infect Dis 1994; 170: 1077-85.
286. Jalal H, Al-Suwaine A, Sonnex C, et al. *The superiority of polymerase chain reaction over an amplified enzyme immunoassay for the detection of genital chlamydial infections*. Sex Transm Infect 2006; 82: 37-40.
287. Tanzi E, Amendola A, Bianchi S, et al. *Human papillomavirus genotypes and phylogenetic analysis of HPV-16 variants in HIV-1 infected subjects in Italy*. Vaccine 2009; 27(S1): A17-23.
288. Frati E, Bianchi S, Colzani D, Zappa A, Orlando G, Tanzi E. *Genetic variability in the major capsid L1 protein of Human Papillomavirus type 16 (HPV-16) and 18 (HPV-18)*. Infect Genet Evol 2011, 11(8): 2119-24.
289. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>
290. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. *The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. Nucl Acids Res 1997; 25: 4876-82.
291. Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Mol Biol Evol 2007; 24: 1596-9.
292. Saitou N, Nei M. *The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol Biol Evol 1987; 4: 406-25.
293. Kimura M. *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. J of Mol Evol 1980; 16: 111-20.
294. Felsenstein J. *Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap*. Evolution 1985; 39: 783-91.
295. Hall TA. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucl Acids Symp Ser 1999; 41: 95-8.
296. Bishop B, Dasgupta J, Klein M et al. *Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies*. J Biol Chem 2007; 282(43): 31803-11.
297. Zuckerkandl E, Pauling L. *Evolutionary divergence and convergence in proteins*. Edited in *Evolving Genes and Proteins* by Bryson V, Vogel HG, Academic Press, New York. 1965; 97-166.
298. Nei M., Gojobori T. *Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions*. Mol Biol Evol 1986; 3: 418-26.
299. Jukes TH, Cantor CR. *Evolution of protein molecules*. In: Munro HN *Mammalian Protein Metabolism*, 1969 Editor Academic Press, New York, USA, 21-132.
300. Kosakovskiy P, Pond SL, Frost SDW. *Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments*. Bioinf 2005; 21(10): 2531-3.

301. Kosakovsky Pond SL, Frost SDW, Muse SV. *HyPhy: hypothesis testing using phylogenies*. *Bioinf* 2005; 21 (5): 676-9.
302. Tamura K, Nei M. *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees*. *Mol Biol Evol* 1993; 10: 512-26.
303. Sheffler K, Martin DP, Seoighe C. *Robust inference of positive selection from recombining coding sequences*. *Bioinf* 2006; 22: 2493-9.
304. Kosakovsky Pond SL, Frost SDW. *Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection*. *Mol Biol Evol* 2005; 22(5): 1208-22.
305. <http://www.openepi.com>
306. World Health Organization. *Sexually transmitted infections*. Fact sheet N°110. Geneva: WHO; 2011.
307. World Health Organization. *10 facts on sexually transmitted infections*. Geneva: WHO; 2011.
308. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosè S, et al. *Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection*. *Vaccine* 2006; 24(S3): 53-61.
309. de Sanjosè S, Diaz M, Castellsaguè X, et al. *Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical Human Papillomavirus DNA in women with normal cytology: A Meta-analysis*. *Lancet Inf Dis* 2007; 7: 453-9.
310. Piana A, Sotgiu G, Castiglia P, et al. *Prevalence and type distribution of human papilloma virus infection in women from North Sardinia, Italy*. *BMC Pub Health* 2011; 11: 785.
311. Masia G, Mazzoleni AP, Contu G, et al. *Epidemiology and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in women of Sardinia (Italy)*. *Vaccine* 2009; 27(S1): A11-6.
312. Martinelli D, Chironna M, Tafuri S, et al. *Epidemiology of HPV infections and cervical cancer in Apulia: a survey study and current data analysis*. *Ann Ig* 2007; 19(6): 499-508.
313. Nielsen A, Kruger Kjaer S, Munk C, et al. *Type-specific HPV infection and multiple HPV types: Prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women*. *Sex Transm Dis* 2008; 3: 276-82.
314. Broccolo F, Chiari S, Piana A, et al. *Prevalence and viral load of oncogenic human papilloma virus types associated with cervical carcinoma in a population of North Italy*. *J Med Virol* 2009; 81(2): 278-87.
315. Brown DR, Shew ML, Qadadri B, et al. *A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women*. *J Infect Dis* 2005; 191(2): 182-92.
316. Hwang LY, Scott ME, Ma Y, et al. *Higher levels of cervicovaginal inflammatory and regulatory cytokines and chemokines in healthy young women with immature cervical epithelium*. *J of Reprod Immunol* 2011; 88(1): 66-71.
317. Manhart LE, Holmes KK, Koutsky LA, et al. *Human papillomavirus infection among sexually active Women in the United States: implications for developing a vaccination strategy*. *Sex transm Dis* 2006; 33: 502-8.
318. [http://dspace.uniroma2.it/dspace/bitstream/2108/1419/3/Capitoli2\\_3\\_4\\_bibliografia.pdf](http://dspace.uniroma2.it/dspace/bitstream/2108/1419/3/Capitoli2_3_4_bibliografia.pdf)
319. Smith JS, Melendy A, Rana RK, et al. *Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review*. *J Adolesc Health* 2008; 43(4): S5-25.
320. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, et al. *For the New Technologies for Cervical Cancer Working Group. Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing human papillomavirus testing alone with conventional cytology as the primary cervical cancer screening test*. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 492-501.
321. Pista A, Oliveira A, Barateiro A, et al. *Molecular variants of human papillomavirus type 16 and 18 and risk for cervical neoplasia in Portugal*. *J Med Virol* 2007; 79: 1889-97.
322. Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, et al. *Intratypic variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective*. *J Virol* 1996; 70: 3127-36.
323. ECDC. *Review of chlamydia control activities in EU countries*. ECDC Technical Report, Stockholm 2008.
324. [www.ministerosalute.it/malattieInfettive/paginaInternaMenuMalattieInfettive.jsp?id=812&menu=strumentieservizi](http://www.ministerosalute.it/malattieInfettive/paginaInternaMenuMalattieInfettive.jsp?id=812&menu=strumentieservizi)
325. Salfa MC, Regine V, Giuliani M, et al. *La sorveglianza delle infezioni sessualmente trasmesse basata su una rete di laboratori: 16 mesi di attività*. *Not Ist Super Sanità* 2010; 23(10): 11-15.
326. Meyers DS, Halvorson H, Luckhaupt S. *Screening for chlamydia infection: an evidence update for the U.S. Preventive Services Task Force*. *Ann Intern Med* 2007; 147: 135-42.
327. *New frontiers: annual report of the National Chlamydia Screening Programme in England*. 2005/06. London: Health Protection Agency; 2006.

328. Jurstrand M, Falk L, Fredlund H, et al. *Characterization of Chlamydia trachomatis omp1 genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden.* J Clin Microbiol 2001; 39: 3915-9.
329. Lister NA, Fairley CK, Tabrizi SN, et al. *Chlamydia trachomatis serovars causing urogenital infections in women in Melbourne, Australia.* J Clin Microbiol 2005; 43: 2546-47.
330. Lysén M, Osterlund A, Rubin CJ, et al. *Characterization of ompA genotypes by sequence analysis of DNA from all detected cases of Chlamydia trachomatis infections during 1 year of contact tracing in a Swedish county.* J Clin Microbiol 2004; 42: 1641-7.
331. Mossman D, Beagley KW, Landay AL, et al. *Genotyping of urogenital Chlamydia trachomatis in Regional New South Wales, Australia.* Sex Transm Dis 2008; 35: 614-6.
332. Nunes A, Borrego MJ, Nunes B, et al. *Evolutionary Dynamics of ompA, the Gene Encoding the Chlamydia trachomatis Key Antigen.* J of Bact, 2009; 7182-92.

## **7. ABSTRACT**

## Introduction

Sexually transmitted infections (STIs) are a major public health concern: according to WHO estimates, 448 million new cases of curable STIs (syphilis, gonorrhoea, chlamydia and trichomoniasis) occur annually throughout the world in adults aged 15-49 years.

There are more than 30 different sexually transmissible bacteria, viruses, mycetes and protozoa. Human Papillomavirus (HPV) and *Chlamydia trachomatis* are the causes of two of the most common STIs.

HPVs are double-stranded DNA viruses, grouped into cutaneous and mucosal types according to their infection site, and further subdivided into high-risk (HR) and low-risk (LR) genotypes, depending on their association with disease malignancy. More than 40 HPV genotypes can infect the genital area: HR-HPVs (e.g. HPV types 16 and 18) can cause cervical cancers and LR-HPVs (e.g. HPV types 6 and 11) can cause genital warts. It has been estimated that more than 50% of sexually active persons become infected with HPV at least once in their lifetime. Most of these infections are asymptomatic or subclinical and, fortunately, usually self-limiting. However, persistence of HPV infection can occur in 30% of cases and when these infections are sustained by HR types the risk to develop cancer is increased.

*Chlamydia trachomatis* is an obligate intracellular bacterium. Currently, 18 different serovars of *C. trachomatis* have been identified, 10 of these infect the genital area. Silent and asymptomatic infection is common in both women and men. In women, acute infection with *C. trachomatis* can result in pelvic inflammatory disease, whose long-term consequences include chronic pain, ectopic pregnancy and infertility. *C. trachomatis* infection has also been demonstrated to be a risk factor for the acquisition of HPV infection.

This work aimed at studying the molecular epidemiology of HPV and *C. trachomatis* infections; carrying out a microbiological surveillance of these infections by molecular and phylogenetic methods; evaluating the HPV/*C. trachomatis* co-infection in sexually active young women aged 13-24 years; evaluating the epidemiological aspects in relation to novel preventive strategies (for example the opportunity to set *C. trachomatis* screening programme).

## Materials and methods

1,557 cervical brush samples were collected from 1,557 women between January 2009 and December 2011. In particular:

- 688 were collected from women aged 25-64 years (median age 36 years);
- 563 from sexually active females aged 13-24 years (median age 19 years);
- 306 from sexually active young women (median age 19 years, range: 19-21 years) vaccinated with a tetravalent HPV vaccine. These samples were collected one year after the end of the vaccination schedule.

All samples were analyzed to identify the presence of HPV infection and genotypes using molecular methods. HPV-16 and HPV-18 positive samples were analyzed through phylogenetic methods in their L1 gene coding for the major capsid protein to characterize the potential vaccine escape mutants and in the LCR to investigate the circulation of geographical variants.

Samples collected from adolescents/young women aged 13-24 years were analyzed to determine the presence of *C. trachomatis* by molecular methods. All *C. trachomatis* positive samples were phylogenetically analyzed in the *ompA* gene (coding for the major membrane protein MOMP) to evaluate the circulating serovars.

## Results

The prevalence of HPV infection in sexually active women aged 13-64 years was 16.5%. In details, among adolescent/young women aged 13-24 years the prevalence was 22.7%, whereas in women aged 25-64 was 11.3%. According to several epidemiological studies, our data show a decrease in prevalence with increasing age of women (26% in 19-24-year old, 18.5% in 25-34-year old, 6.9% in the 35-44 years old and 4.9% in the 45-64 years old).

Over 86% (among women aged 25-64 years) and 64% (among women aged 13-24 years) of the detected infections were attributable to HR genotypes. The type-specific

prevalence showed HPV-16 as the predominant type, being 22.7% among HPV-positive women aged 25-64 years and 20% among those aged 13-24 years.

The prevalence of HPV infections observed in young women vaccinated with tetravalent HPV vaccine was 17.3%, significantly lower ( $p < 0.05$ ) than that (26%) observed in age-matched unvaccinated population. It is noteworthy that, though the occurrence of infections decreased in vaccinated women, the number of HPV-genotypes involved in such infections remained constant; most of these infections were sustained by HR-clade genotypes.

Virological surveillance is necessary to capture potential changes in circulating viruses and the potential emergence of escape mutants, which may affect the vaccine efficacy. Thus, the phylogenetic analysis of the two prevalent oncogenic HPV (HPV-16 and HPV-18) identified the spread of European variants in analyzed samples. Only two HPV-16 sequences belonged to Asian-American lineage.

To understand the circulation of potential escape mutants, characterization of the L1 protein showed 11 amino acid mutations in HPV-16 and 7 in HPV-18. Of these mutations 27.3% and 42.9%, respectively, fell into L1 epitopes. Nevertheless, analysis of selective pressures showed that these sequences were under strong purifying selection.

The prevalence of *C. trachomatis* infections in adolescent/young women aged 13-24 years was 5.7%. The phylogenetic analysis of *C. trachomatis* positive samples demonstrated 7 different serovars (D, E, F, G, H, J, and K). The prevalent serovars were the E and F - 38.1% and 23.8%, respectively. It has been demonstrated that serovars E and F have a biological advantage over the other serovars thanks to both their ability to escape the host immune response and the presence of specific virulence factors, which can facilitate the transmission and infectious processes.

Three percent of adolescent/young women had *C. trachomatis*/HPV co-infection. The prevalence of *C. trachomatis* infection was higher among HPV-DNA positive women than among HPV-negative ones (13.2% vs. 3.4%,  $p < 0.001$ ), thus suggesting that persons with an ongoing STI are more likely to acquire other STIs.

### **Conclusion**

The results of this research project provide new information on the spread of HPV and *Chlamydia trachomatis* infections in women aged 13-64.

In the HPV vaccination era, epidemiological studies and virological surveillance of HPV infections in the general population can improve the understanding of the natural history and dynamics of the HPV infection, can shed lights on how the vaccines affect the incidence of HPV-infection and can point out whether current vaccines can confer cross-protection against other viral types.

The HPV/*Chlamydia trachomatis* co-infections observed in adolescent/young women emphasize the greater vulnerability of this cohort with risky sexual behaviors. These results suggest that the introduction of a screening program for *Chlamydia trachomatis* in Italy should be considered to better understand the spread of this infection and to early treat the subjects.