

APPROCCIO BIOMOLECOLARE NELLA DIAGNOSTICA DELL'HPV: IL RUOLO DELLE NUOVE TECNOLOGIE NELLO STUDIO DELL'HPV-DNA. ATTUALITÀ E PROSPETTIVE

Andrea Tinelli, Daniele Vergara, Giuseppe Leo, Ughetta Vergari, Raffaele Tinelli,
Antonio Malvasi

Unità Operativa di Ginecologia e Ostetricia, Ospedale "Vito Fazzi", ASL Lecce 1, Lecce

Indirizzo per corrispondenza: Dott. Andrea Tinelli

Unità Operativa di Ginecologia e Ostetricia, Ospedale "Vito Fazzi", ASL Lecce 1, Lecce

P.tta Panzera 7, 73100 Lecce (LE) Italia

tel: +39 0832 307972; fax: +39 0832 661511; e-mail: andtinelli@libero.it

ABSTRACT

Human papillomaviruses (HPVs) are small double-stranded DNA viruses of approximately 7900 bp that infect the human epithelium and cause hyperproliferation; the whole genomes of about 100 types have been isolated and completely sequenced. The classification can be based on the lesions that they cause: one subset causes common warts and the other subset, which infects anogenital mucosa (40 different types), causes genital warts and various forms of cancer in men and women. Because the detection and type-specific classification of HPV infection by an in vitro viral culture test is not possible and serological tests are still ineffective, a molecular DNA diagnosis is needed. Test of HPV is a useful adjunctive tool of Pap test to screen cervical cancer, in order to permit selection of those patients who are at increased risk for disease and therefore may provide additional clinical value. The DNA sequence analysis, with some limitations, seems to be more appropriate for genotyping than hybridization methods. HPV DNA-chip analysis is highly accurate for detection and genotyping of HPV and may have potential value as a robust, high-throughput screening test of uterine cervix cancer.

Key words: HPV; DNA-chip; genotyping; PCR

RIASSUNTO

I Papillomavirus umani (HPV) sono dei piccoli virus con DNA circolare a doppia elica, contenenti approssimativamente 7900 paia di basi (bp), che infettano l'epitelio umano, causandone l'iperproliferazione; sono già stati isolati e totalmente sequenziati circa 100 tipi di genomi di HPV e la classificazione degli stessi viene solitamente eseguita sulla base delle lesioni che provocano: alcuni sottotipi generano delle comuni verruche mentre altri, che infettano la mucosa anogenitale (40 sottotipi), originano condilomi genitali e varie forme di cancro maschile e femminile. Poiché l'isolamento e la classificazione delle infezioni da virus dell'HPV mediante test su cultura in vitro non è effettuabile e i test sierologici sono ancora inefficaci, è necessaria una diagnosi molecolare sul DNA. Il Pap Test è un utile mezzo di screening per il cancro cervicale, giacché permette la selezione delle pazienti a rischio per tale patologia e un'ulteriore valutazione clinica; l'analisi delle sequenze del DNA, seppur viziata da alcuni limiti, sembra essere il test più efficace per studiare il genotipo rispetto ai metodi di ibridizzazione. L'analisi con gli HPV DNA-Chip è un metodo molto accurato per l'identificazione e la genotipizzazione dell'HPV e acquista un valore aggiuntivo come test di screening valido ed altamente efficace per l'identificazione del cancro cervicale.

Parole chiave: HPV; DNA-chip; genotyping; PCR

INTRODUZIONE

L'HPV (Human Papilloma Virus) è un virus responsabile di molte lesioni dell'apparato genitale femminile e maschile, si trasmette prevalentemente con l'attività sessuale e ha la massima incidenza tra i 20 e i 40 anni. La zona più facilmente aggredibile dal virus è la giunzione squamo-colonnare del collo dell'utero; dove le cellule infette si possono lentamente trasformare in cellule neoplastiche e dar vita ad una neoplasia in quanto l'HPV, essendo un virus a DNA, riesce ad entrare nel nucleo delle cellule ospiti per trasformarle prima in cellule pre-neoplastiche e poi in cellule neoplastiche.

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

EPIDEMIOLOGIA DELL'HPV

Nel 1842 un medico italiano, Rigoni-Stern aveva ipotizzato che fattori sessualmente trasmessi potessero intervenire nella genesi del carcinoma

della cervice uterina. Barrett dimostrò nel 1954, su di un gruppo di marinai portatori di condilomi, l'insorgenza di lesioni da HPV nelle rispettive mogli dopo 5-6 settimane dal loro ritorno sulla terra ferma. In uno studio del 1976, Kessler dimostrava inoltre come il rischio di sviluppare un cervico-carcinoma fosse tre volte maggiore nelle donne sposate ad uomini alle cui precedenti mogli era stata diagnosticata una neoplasia della portio o che avevano avuto molteplici *partners* sessuali; veniva così introdotto per la prima volta il concetto di "maschio a rischio".

Nel 1968 alcuni ricercatori identificarono l'HPV (Human Papillomavirus) come agente dei condilomi acuminati e, verso la fine degli anni '70 ed inizio anni '80, diversi ricercatori focalizzarono l'attenzione clinica sugli HPV come possibili importante agente nella oncogenesi della cervice uterina (1).

Il rischio d'insorgenza del carcinoma cervicale è 4 volte superiore nelle prostitute e nelle donne che iniziano l'attività sessuale prima dei 17 anni, e 7 volte superiore nelle donne con molteplici *partners*; tale rischio è invece notevolmente minore in chi usa metodi contraccettivi di barriera (diaframma, condom) ed è pressoché nullo in donne che non presentano attività sessuale (2).

Le donne la cui intensa vita sessuale predispone all'acquisizione di malattie sessualmente trasmesse (MST), costituiscono un gruppo ad alto rischio per il cervico-carcinoma, come dimostrato da vari studi epidemiologici; grazie a questi, si sono delineati dei gruppi a rischio caratterizzati da donne con precoce inizio dell'attività sessuale, con *partners* multipli, con molteplici gravidanze, la prima gravidanza in età giovanile, un basso stato socio economico e scarsa igiene sessuale.

Poiché, quindi, il carcinoma cervicale è pressoché assente nelle vergini, sembrerebbe logico concludere che l'andamento di tale neoplasia sia praticamente sovrapponibile a quello delle MST e che, quindi, possa essere prevenuto, non solo con la diagnosi precoce, ma anche con la tutela e la prevenzione che si consiglia e si adotta nel caso delle MST (3).

Da tali dati, l'attenzione è stata rivolta via via ad una serie di agenti sessualmente trasmessi, che, se singolarmente analizzati, mostravano correlazioni statisticamente significative con la neoplasia cervicale; tuttavia, allo stato attuale, non emergono dati a favore di un singolo agente rispetto agli altri (4).

HPV, CARATTERISTICHE STRUTTURALI E METODICHE COLTURALI

Nella metà degli anni '50 e '60 quando i papillomavirus e i poliomavirus divennero oggetto di studio per la microscopia elettronica e l'analisi genomica, questi due gruppi furono caratterizzati per avere un genoma di DNA circolare e particelle di simmetria icosaedrica senza rivestimento (2); come conseguenza di ciò furono considerati strettamente imparentati e accomunati nella famiglia dei papovavirus (*Papovaviridae*).

Studi di sequenza e funzionali condotti negli anni 80 dimostrarono come le similitudini fossero troppo superficiali per poter stabilire una relazione; in particolare, i poliomavirus ed i papillomavirus non condividono nessuna sostanziale omologia nucleotidica e aminoacidica, con l'eccezione di un piccolo segmento omologo nelle regioni dell'antigene T e del gene E1, rispettivamente.

Poiché le classificazioni tassonomiche dovrebbero riflettere relazioni naturali, fu concluso che questi virus formassero due famiglie separate; solo recentemente la famiglia dei papillomavirus (*Papillomaviridae*) è stata ufficialmente riconosciuta dal Consiglio Internazionale di Tassonomia dei Virus (ICTV) (2).

I Papillomavirus sono associati dall'abbreviazione PV preceduta da una o due lettere che indicano la specie ospite; i vari tipi virali sono identificabili da un numero che descrive la sequenza cronologica della loro scoperta, es.

HPV-1, HPV-2, etc e l'assegnazione di un nuovo numero e quindi la pubblicazione di un nuovo tipo, può avvenire solo dopo la registrazione della sequenza presso il *German Research Center* di Heidelberg, dove si verificherà l'esistenza di una diversità nucleotidica del 10% tra la sequenza L1 del nuovo ipotetico tipo e quella di tutti gli altri tipi conosciuti finora (5).

Il termine *subtype* è stato usato per la prima volta negli anni '80 per identificare tipi virali con un *pattern* di restrizione differente; al momento il sottotipo si riferisce ad un *pattern* conosciuto la cui sequenza del gene L1 differisce dal 2 al 10% da quella di un altro tipo, mentre le varianti differiscono di circa il 2% dall'isolato originale, che in questo caso è definito come prototipo.

Gli studi hanno dimostrato che c'è apparentemente solo un limitato numero di varianti comuni per ciascun tipo virale e che le varianti che mostrano il massimo grado di divergenza sono quelle provenienti da gruppi etnici che si sono evoluti senza venire a contatto tra di loro, per esempio Africani ed Indiani Americani; tali varianti differiscono nelle loro proprietà chimiche, biologiche e patogene (5).

Dal punto di vista molecolare l'HPV è un virus relativamente piccolo, senza rivestimento, di 55 nm di diametro, ha un capsido icosaedrico composto da 72 capsomeri, che contengono almeno due proteine capsidiche, L1 ed L2; ciascun capsomero è un pentamero della proteina capsidica maggiore, L1, ciascun capsido virionico contiene diverse copie (circa 12 per virione) della proteina capsidica minore, L2 e il genoma virale consiste di una singola molecola di DNA circolare a doppia elica, contenente approssimativamente 7900 paia di basi (bp) associate a proteine istoniche (5).

La biologia dei Poliomavirus è stata oggetto di numerosi studi già da anni, mentre, la ricerca sui Papillomavirus (PV) è relativamente recente; lo studio di questi virus è stato fino ad ora ostacolato dall'impossibilità di coltivarli in un ospite non umano e di infettare o trasformare cellule in coltura.

La complessa natura delle interazioni virus-ospite non è infatti riproducibile in condizioni sperimentali, per il fatto che le funzioni replicative del virus, quali sintesi del DNA, sintesi del capsido e l'assemblaggio del virione avvengono solo in cellule epiteliali squamose differenziate.

Le innovazioni tecnologiche di recente introduzione hanno permesso di sviluppare sistemi di colture cellulari da espianti di tessuto cervicale; queste vanno incontro a diversi passaggi, ma restano tuttavia delle *short term cultures*, anche se, recentemente, terreni privi di siero hanno notevolmente migliorato la durata delle colture, consentendo una iniziale maturazione delle cellule.

La mancanza di efficaci sistemi di colture in vitro per tali virus è stata tuttavia sostituita brillantemente da altre metodiche quali, ad esempio, il clonaggio molecolare, che ha rilevato l'estrema eterogenicità degli HPV e ampliato le conoscenze sulle loro proprietà fisico-chimiche.

Grazie al clonaggio molecolare in plasmidi o batteriofagi, sono stati identificati, finora, oltre 100 tipi di HPV distinti in base alla composizione del DNA e classificati secondo l'ordine di identificazione (6).

LE VARIANTI DELL'HPV

Un importante fattore emergente nello sviluppo della neoplasia cervicale è il ruolo svolto dalle varianti dell'HPV; tali varianti differiscono sia nelle loro proprietà chimiche, biologiche e di patogenicità.

Sulla base delle differenze nucleotidiche delle regioni L1, L2, LCR dell'HPV 16 è stato possibile definire 5 *cluster*: europeo (E), asiatico (As), asiatico americano (AA), africano-1 (Af1), africano-2 (Af2). Variazioni intratipiche di sequenza sono state anche trovate nei geni E2, E4, E5, E6 ed E7.

L'oncogenicità delle specifiche varianti varia sia geograficamente che con

l'origine etnica della popolazione studiata. Alcuni studi suggeriscono ad esempio che a causa dell'aumentata attività trascrizionale e a causa di cambiamenti negli elementi di risposta al progesterone, la variante asiatica-americana potrebbe avere un'aumentata attività oncogenetica comparata con quella della variante europea. Le varianti europee con mutazioni puntiformi nella regione LCR, hanno un'attività trascrizionale migliore di quella del prototipo europeo.

Le variazioni di sequenza sono state anche analizzate per i tipi virali a basso ed intermedio rischio ed in particolare per i tipi a basso rischio 6 e 11. Nessuna variazione di sequenza è stata associata con un aumento dell'attività del promotore responsabile dell'espressione delle proteine E6 ed E7 (6).

ORGANIZZAZIONE E FUNZIONE GENOMICA DELL'HPV

Il genoma è funzionalmente distinto in tre regioni: la prima è la regione non codificante (*Upstream Regulatory Region* o URR), nota anche come *long control region* (LCR), della lunghezza di 400-1000 bp, che contiene il promotore p97 fiancheggiato da sequenze *enhancer* e *silencer* che regolano la replicazione delle altre sequenze controllando la trascrizione delle ORF, sequenze nucleotidiche formate da triplette che specificano aminoacidi in un modulo di lettura aperto cioè senza codoni di stop.

La regione LCR contiene inoltre il più alto grado di variabilità nel genoma virale.

La seconda è la regione precoce, che consiste delle ORF E1, E2, E4, E5, E6 ed E7, individuate con numerazione progressiva in funzione della loro decrescente lunghezza; queste ORF sono coinvolte nella replicazione virale e nell'oncogenesi.

La terza è la regione tardiva che codifica per le proteine strutturali del capsido virale L1 ed L2; le varie ORF presentano sovrapposizioni parziali a livello terminale e i due ORF L, che corrispondono a circa il 40% del DNA virale, codificano per le proteine strutturali del capsido: L1 per la proteina maggiore comune a tutti gli HPV, contro cui viene generalmente prodotta la maggior parte degli anticorpi ed L2 per una proteina minore che mostra invece una elevata variabilità tra i differenti tipi di HPV (7).

Entrambi gli ORF L1 ed L2 sembrano dipendere dai segnali di differenziazione provenienti dalla cellula ospite o, in altre parole, come verrà accennato successivamente, la replicazione virale è strettamente dipendente dalla differenziazione terminale della cellula epiteliale.

È stato, infatti, riportato come le proteine capsidiche siano comunemente rilevabili in lesioni altamente differenziate ma, solo raramente o mai, nei CIN (neoplasia cervicale intraepiteliale) ad alto grado (HSIL) o nei cancro invasivi (dove il virus perde la sua capacità replicativa).

La regione E si estende, infine, per circa il 45% del genoma virale e contiene differenti ORF numerati progressivamente da E1 ad E8 e di alcuni dei quali non è tuttavia ancora nota la funzione; tra questi, l'E4 sembra codificare per una proteina strutturale, il cui ruolo preciso è tuttora ignoto, anche se alcuni ricercatori ipotizzano che il suo mRNA costituisca il principale RNA nei condilomi acuminati indotti da HPV, mentre all'ORF E1 è attribuita la funzione di mantenere il DNA in condizione extracromosomiale.

Le proteine codificate dall'ORF E2 rappresentano proteine chiave nella regolazione dell'intero genoma virale in quanto svolgono sia funzione di attivazione che di repressione sulla trascrizione del DNA e, in particolare, il legame di queste proteine con specifiche sequenze del DNA, localizzate nella regione URR, inibirebbe la trascrizione degli ORF E6 ed E7 alle quali, peraltro, si attribuisce il potere mutageno e trasformante degli HPV ad alto rischio.

Pertanto, l'inattivazione funzionale dell'ORF E2 si traduce in una sovraesposizione autonoma ed incontrollata delle proteine E6/E7; questa condizione si realizza nel momento in cui il DNA virale si integra con quello della cellula ospite; infatti, la rottura della molecola circolare di DNA virale, indispensabile perché se ne verifichi l'integrazione in quello cellulare, coinvolge costantemente l'ORF E2 conducendo alla perdita di materiale genetico compreso tra E1-E2-L2, a valle del punto di rottura; la sola regione integrata è costituita pertanto da E6/E7 e URR.

Il fenomeno dell'integrazione è ormai da tempo ritenuto un evento chiave nella trasformazione in senso neoplastico HPV-indotta; a riprova di ciò, la trascrizione attiva e la traslazione delle regioni E6/E7 sono state dimostrate in linee di cellule derivate da tumori cervicali.

I prodotti di trascrizione degli ORF E6/E7 sono tre proteine E6, E7 ed E6* (detta *sliced* o corta), che non sembra possedere effetto mutageno, mentre le oncoproteine E6 ed E7 si legano principalmente alle proteine cellulari p53 e pRB, fosfoproteine nucleari che regolano il ciclo cellulare; la proteina E7 è una proteina a basso peso molecolare di circa 100 aminoacidi (aa), che non sembra possedere nessuna intrinseca attività enzimatica.

Come altre oncoproteine codificate da piccoli virus tumorali a DNA, questa proteina si associa e modifica le funzioni dei complessi proteici cellulari; il dominio amino-terminale di E7 ha similarità di sequenza con una piccola porzione della regione conservata 1 (CR1) e con CR2 della proteina E1A di adenovirus e queste sequenze si ritrovano conservate anche nell'antigene T di SV40.

La sequenza E7 carbossi-terminale contiene due copie del motivo CXXC, separate da 29 aa; tale dominio può legare i metalli e funzionare come dominio di dimerizzazione (8).

Come la proteina E1A di adenovirus e l'antigene T di SV40, E7 interagisce con la proteina RB e quelle collegate p107 e p130, attraverso la sequenza conservata LXCXE all'interno della regione CR2; l'abilità di E7 di associarsi con pRB è critica per la capacità del virus di generare e/o mantenere uno stato favorevole alla sua replicazione.

Infatti, le mutazioni nel dominio LXCXE impediscono il ciclo vitale di HPV. E7 interagisce inoltre con altre proteine coinvolte nel ciclo cellulare tra cui p21^{CIP1} e p27^{KIP1}, inibitori delle chinasi cdk-ciclina, anche se la rilevanza biologica di molte di queste interazioni deve essere, comunque, ancora determinata.

Varie metodiche sono state utilizzate per isolate numerose altre proteine che interagiscono con E7, tra cui i fattori di trascrizione, i regolatori del ciclo cellulare e gli enzimi metabolici.

Il dominio carbossi-terminale della proteina contribuisce inoltre all'associazione con enzimi coinvolti nella modificazione della cromatina, in particolare deacetilasi e acetil transferasi istoniche. E7 interagisce inoltre con i coattivatori trascrizionali p300, CBP e pCAF (9).

La proteina E6 è una piccola proteina di circa 160 aa che consiste di due motivi accoppiati CXXC; questa proteina elimina la risposta cellulare stimolata dall'attività di E7, attraverso l'inattivazione di p53 che, se è mutata o sequestrata (condizione di instabilità genetica), qualunque anomalia del DNA determina una non risposta senza controllo.

Questo processo è essenziale per il ciclo vitale dei genotipi ad alto rischio (10).

La proteina E6 non interagisce direttamente con p53 ma forma un complesso con la proteina cellulare E6-AP, che è essenziale per l'interazione con p53; infatti, E6-AP non interagisce con p53 in assenza della proteina E6, ma i suoi substrati normali sono ancora sconosciuti.

Il legame con E6-AP indirizza p53 verso il macchinario di degradazione proteosomica; la proteina E6 potrebbe interagire con fattori cellulari addizionali che sono importanti per l'attività trascrizionale di p53, come la proteina p300 ed il co-fattore trascrizionale ADA3.

Un dato scientifico importante è che E6 possiede inoltre un'attività tra-

sformante indipendente da p53; la proteina contiene infatti un dominio di legame carbossi terminale, PDZ e tutte le proteine che possiedono tale dominio funzionano come centri di organizzazione molecolare in molte *pathways* di trasduzione del segnale (10).

CICLO DI REPLICAZIONE VIRALE E DI INTEGRAZIONE DELL'HPV NELLA CELLULA OSPITE

Il normale ciclo di replicazione virale è un processo altamente regolato, dipendente sia da alcune proteine codificate dal proprio genoma, che dal grado di differenziazione della cellula epiteliale ospite; l'infezione ha solitamente inizio nelle cellule basali e parabasali dell'epitelio squamoso in quanto capaci di attività mitotica e, affinché si produca l'infezione attiva, il virus deve poter accedere al compartimento "generativo" dell'epitelio. Tale condizione potrebbe spiegare l'estrema suscettibilità della "zona di trasformazione" della cervice uterina all'infezione virale; infatti, in questa area, le cellule basali e parabasali della giunzione squamo-colonnare appaiono costantemente esposte all'ambiente e quindi costituiscono un potenziale e accessibile bersaglio per l'HPV.

L'interazione HPV-cellula realizza quadri diversi in funzione del differente stato replicativo virale: infezione allo stato latente, infezione produttiva e integrazione del DNA virale in quello cellulare (11).

Nella fase iniziale dell'infezione, quando cioè il virus colonizza le cellule basali e parabasali dell'epitelio, il genoma virale va incontro ad una replicazione in forma episomale essendo presente come frammento extracromosomico di DNA circolare; in tale fase, la replicazione episomale o precoce, responsabile dello stato latente dell'infezione, conduce alla formazione di una sola copia di DNA virale per cellula ospite.

Tale quota risulta inferiore alla soglia di sensibilità dei test più comunemente in uso per l'identificazione del DNA dell'HPV; pertanto, non appare possibile rilevare il DNA episomale nelle singole cellule né individuare il virus allo stato latente.

Il significato dell'infezione latente è ancora poco conosciuto, né è noto per quanto tempo l'HPV possa mantenere tale stato o in quale percentuale di casi l'infezione latente possa progredire in infezione produttiva; le condizioni che favoriscono tale viraggio sono tuttora incerte, anche se emerge con sempre maggiore chiarezza il ruolo che lo stato immunologico svolge sull'interazione virus-cellula (immunodepressione congenita o acquisita, terapie immunosoppressive e gravidanza).

Quando l'infezione diviene produttiva, l'espressione dei geni virali procede sequenzialmente dai geni precoci (E) ai geni tardivi (L), seguendo la differenziazione in senso squamoso dell'epitelio, a partire dalle cellule basali e parabasali (dove le porzioni precoci del genoma virale sono più attive) fino agli strati superiori dell'epitelio (intermedio e superficiale), in cui si assiste ad una significativa produzione di proteine capsidiche ed alla formazione del virione completo, ovvero della particella virale infettante (11).

Il passaggio dallo stato di latenza episomale a quello produttivo è favorito da una condizione di cosiddetta "permissività cellulare"; nella "cellula permissiva", in cui il virus si moltiplica realizzando un ciclo litico-citopatico, si assiste alla penetrazione dell'HPV nel nucleo cellulare, laddove, una volta perso l'involucro capsulare, il suo DNA viene codificato per la sintesi dei messaggeri ed avviene la produzione delle proteine precoci caratteristiche della trasformazione.

In tali condizioni, pertanto, il virus si moltiplica come entità autonoma, il DNA cellulare viene inibito e la cellula, nonostante la presenza delle proteine trasformanti, non si trasforma e muore.

Nella "cellula non permissiva" si realizzano le prime fasi del ciclo virale che conducono alla sintesi delle proteine precoci; in queste condizioni, tuttavia, il virus diviene lineare, in quanto scisso in un punto preciso del

DNA e si integra stabilmente nel genoma della cellula ospite diventando, in pratica, un gene soprannumerario (12).

La sintesi delle proteine precoci non è seguita da quella delle proteine tardive a causa di un'inibizione della loro espressione; il virus non va incontro, pertanto, a replicazione e scompare come entità autonoma.

Il passaggio alla fase attiva dell'infezione sembra essere condizionato, oltre che dallo stato di permissività cellulare, anche da una certa suscettibilità individuale, dalla presenza di determinati tipi virali e dall'azione di cofattori locali; le caratteristiche dell'epitelio cervicale, costituito in abbondanza da cellule di riserva subcolonnari e cellule metaplastiche, in attiva proliferazione, rappresentano un terreno fertile per la penetrazione e la replicazione virale (12).

MODALITÀ DI TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE DA HPV

L'HPV infetta le cellule basali dell'epitelio squamoso cervicale più comunemente per via sessuale, in presenza di un partner con infezione clinica o subclinica genitale, attraverso microtraumatismi del tessuto provocati dal rapporto sessuale; la topografia delle lesioni è pertanto tipica delle sedi caratterizzate da una maggiore fragilità epiteliale (zona di trasformazione a livello cervicale, piccole labbra e vestibolo a livello vulvare).

Il frequente riscontro di DNA virale in tessuti genitali apparentemente sani (infezione latente) porta a ritenere che tali siti anatomici costituiscono un'importante riserva virale; il recente riscontro di una scarsa concordanza tra i tipi virali isolati a livello genitale in *partners* di coppie stabili ha portato, tuttavia, a rivedere il concetto di trasmissione esclusivamente venerea dell'infezione (13).

Un contagio attraverso fomenti, ovvero un qualsiasi oggetto inanimato (pinza da biopsia, speculum, asciugamani, etc.) su cui sia presente DNA virale infettante, è peraltro documentato.

Sembra inoltre possibile un contagio materno-fetale dell'infezione, che avverrebbe prevalentemente per diffusione intrapartum attraverso il contatto delle mucose neonatali (congiuntivali, orofaringee) con quelle materne infette.

Tuttavia, il reale rischio di tale modalità di trasmissione oltre che la sua implicazione clinica sono tuttora oggetto di ulteriori approfondimenti e non appaiono particolarmente significativi.

L'infezione da HPV è molto comune in giovani donne sessualmente attive, di età compresa fra i 18 ed i 30 anni e la sua incidenza diminuisce nettamente dopo i 30 anni. Tuttavia, il cancro alla cervice è più comune nelle donne di età > 35 anni, suggerendo l'ipotesi che l'infezione possa essere contratta in giovane età ed evolvere con progressione lenta verso il cancro (14).

La persistenza dell'infezione è un fenomeno certamente più comune per i genotipi ad alto rischio, anche se l'infezione con un genotipo ad alto rischio è necessaria, ma non sufficiente, per lo sviluppo del carcinoma; molti studi suggeriscono che la possibilità che una donna sviluppi il cancro cervicale dipende da una varietà di fattori addizionali che sono in concerto con il genotipo virale.

Lo stato immunitario dell'ospite è uno dei fattori che influenza maggiormente la storia naturale dell'infezione da HPV; la risposta primaria all'infezione da HPV è del tipo celluloso-mediata, motivo per cui le condizioni che compromettano il sistema immunitario possono aumentare il rischio (14).

COMUNI METODOLOGIE DIAGNOSTICHE DELL'HPV

La diagnosi di infezione da HPV si basa essenzialmente sull'utilizzo di citologia, colposcopia ed esame istologico, ed anche sull'applicazione di

altre metodiche, quali la microscopia elettronica, l'immunoistochimica e la biologia molecolare.

La Citologia

Si basa sul rilievo degli effetti citopatici indotti dal virus sulle cellule dell'epitelio cervicale: coilocitosi (presenza di un ampio alone perinucleare), discheratosi e bi-multinucleazione.

La presenza isolata di uno di questi reperti è compatibile o suggestiva, ma non decisiva, per la diagnosi di infezione da HPV; in realtà l'accuratezza diagnostica della citologia risulta a tale proposito inferiore a quanto comunemente ritenuto, attestandosi intorno al 60%, quando confrontata con quella dell'esame istologico su biopsia mirata.

La Colposcopia

Metodica diagnostica indispensabile e, ormai, di uso routinarie: per la diagnosi di infezione subclinica da HPV e per la definizione topografica delle lesioni; la sua accuratezza diagnostica è elevata e si attesta intorno al 90%.

L'Istologia e i criteri istopatologici d'infezione virale da HPV

Un significativo numero di cellule infettate dall'HPV in fase attiva di replicazione non completa il suo normale ciclo mitotico e presenta la duplicazione del suo DNA in assenza di suddivisione cellulare; tale errore mitotico può ripresentarsi nei cicli successivi dando origine ad uno degli aspetti morfologici più rappresentativi della lesione virale, ovvero la bi-multinucleazione.

La poliploidia è sempre accompagnata da lievi atipie nucleari (picnosi o ingrandimento ed omogeneizzazione della cromatina, variazioni di colorazione e di forma).

La Microscopia-elettronica

Con tale metodica è possibile documentare la presenza di particelle virali in circa il 50% dei casi d'infezione clinica e subclinica.

L'Immunoistochimica

Essa consente la ricerca degli antigeni capsidici virali mediante l'impiego di antisieri specifici in lesioni mature, che presentino, cioè, la produzione delle proteine strutturali capsidiche del virus.

Sia la microscopia elettronica che l'immunoistochimica permettono l'individuazione dei soli prodotti di codificazione tardiva del gene virale (6).

NUOVI APPROCCI METODOLOGICI NELLA DIAGNOSTICA DELL'HPV

La Tipizzazione del DNA

I test di ibridazione molecolare degli acidi nucleici erano, fino a poco tempo fa, gli unici metodi in grado di determinare la presenza virale anche in tessuto apparentemente sano (infezione latente) e fornire precise informazioni circa lo stato dell'HPV-DNA nella cellula ospite (episomale, integrato).

In commercio vi sono varie categorie di test di tipizzazione dell'HPV-DNA nella cellula ospite:

- L'ibridazione Blot (Southern Blot, Dot Blot, Line-blot), il cui bersaglio è costituito dall'acido nucleico dell'HPV estratto dalle cellule o tessuti;
- L'ibridazione in situ (FISH, *Filter In Situ Hybridization* o TISH, *Tissue In Situ Hybridization*), il cui bersaglio è rappresentato dall'acido nucleico virale contenuto nei nuclei delle cellule infettate. Sebbene la sensibilità di questo metodo è limitata, permette la localizzazione dell'infezione virale con altri marker (15).

Alternativamente, l'HPV può essere isolato dai campioni clinici e rivelato con le tecniche di ibridazioni blot che quelle in situ, dove l'individuazione del DNA virale è ottenuta utilizzando una sonda di acido nucleico tipo-specifica nota e marcata con sostanze radioattive o con sistemi rivelatori evidenziabili mediante tecniche immunoistochimiche.

Il Southern blot era ritenuto fino a qualche tempo fa il metodo di riferimento; esso consiste nell'analisi dei frammenti di DNA virale digeriti con enzimi di restrizione, enzimi che tagliano la molecola solo in punti precisi, separati su di un gel d'agarosio e trasferiti su una membrana di nylon o di nitrocellulosa (15).

L'ibridazione Dot blot è una variante del Southern blot in quanto il DNA è posto immediatamente su di un supporto solido, senza necessità di digestioni enzimatiche, e quindi ibridato con le sonde nucleotidiche; tra i metodi di rivelazione molecolare dell'HPV-DNA di più recente messa a punto, il dosaggio a cattura degli ibridi e sicuramente quello di più facile esecuzione e flessibilità.

Quest'ultimo è l'unico attualmente approvato dalla Food and Drug Administration, ed è denominato 'Hybrid Capture II system' (Digene Corporation), è un test che consente la simultanea determinazione di ceppi ad alto o a basso rischio oncogeno attraverso l'ibridazione in fase liquida del DNA virale eventualmente presente nel campione con una miscela di sonde ad RNA.

Sensibilità, specificità ed applicazioni pratiche differiscono sensibilmente tra le diverse tecniche, ma certamente sono poco adatte, soprattutto la tecnica Southern, per gli screening intensivi; per questo motivo, nuovi metodi di amplificazione degli acidi nucleici sono stati sviluppati per aumentare la sensibilità così come la specificità della rivelazione virale (16). La Polimerase Chain Reaction (PCR), di più recente introduzione nella diagnostica virale, rappresenta una tecnica di sintesi ed amplificazione enzimatica in vitro di specifiche sequenze di DNA e permette di rivelare quantità minime di genoma virale, anche quando il DNA bersaglio è di qualità o quantità insufficiente per essere analizzato con successo dalle altre metodiche (16).

Anche se da un lato la tecnica di PCR permette la rivelazione del genotipo, non può fornire da sola indicazioni circa il tipo virale presente; allo stesso modo l'Hybrid Capture non permette di distinguere lo specifico genotipo virale, ed ha certamente una sensibilità inferiore a quella della PCR.

Allo scopo di ottenere informazioni precise circa il genotipo virale presente nel campione clinico, sono state sviluppate varie tecniche di tipizzazione, tra queste, il sequenziamento automatico del DNA si afferma, con pregi e difetti, come una delle più valide.

Un acido nucleico consiste in una sequenza di subunità unite tra di loro da legami chimici; ogni subunità contiene una base azotata (un anello eterociclico di atomi di carbonio e di azoto), un pentoso e un gruppo fosfato.

Gli acidi nucleici contengono due diversi tipi di pentosi, nel DNA lo zucchero è il 2'-deossiribosio, mentre nell'RNA è il ribosio; la differenza che distingue i due pentosi consiste nella presenza/assenza del gruppo ossidrilico in posizione 2' dell'anello, mentre la base azotata è legata alla posizione 1' dell'anello del pentoso mediante un legame glicosidico.

Una base unita ad un pentoso costituisce un nucleoside; quando a questo si aggiunge un gruppo fosfato si parla di nucleotide i nucleotidi 5'-trifosfati sono i precursori nella sintesi degli acidi nucleici; tutti i nucleotidi possono esistere in una forma che porta più di un gruppo fosfato legato alla posizione 5'.

I legami tra il primo (α) e il secondo (β) fosfato, e tra il secondo e il terzo (γ), sono legami ricchi di energia; tra il fosfato in α e il gruppo 3'-OH del pentoso all'estremità della catena si forma un legame (legame fosfodiesterico), mentre i due gruppi terminali del trifosfato vengono rilasciati come pirofosfato.

Le DNA polimerasi sono enzimi dotati della capacità di sintetizzare un nuovo filamento di DNA a partire da un filamento stampo; la DNA polimerasi può anche però incorporare analoghi dei nucleotidi.

Il metodo dei dideoossi per il sequenziamento del DNA sviluppato da Sanger, si avvale proprio di questo principio e utilizza 2',3'-dideossinu-

cleotidi come substrato (ddNTP); quando un dideossinucleotide è incorporato all'estremità 3' terminale della catena crescente, l'allungamento della catena è bloccato selettivamente alla base A, C, G o T poiché la catena manca del gruppo 3' idrossilico.

Nella strategia di sequenziamento marcatori fluorescenti colorati sono aggiunti durante la fase di allungamento della catena usando o *primer* marcati all'estremità 5' (*dye primer*) o dideossinucleotidi trifosfato marcati con un colorante all'estremità 3' (*dye terminator*).

Il sequenziatore rivela quindi la fluorescenza proveniente da quattro differenti coloranti usati per identificare le quattro basi durante l'allungamento; ciascun colorante emette ad una propria lunghezza d'onda quando è eccitato da una laser ionico ad argo; tutti e quattro i colori e di conseguenza le quattro basi possono essere quindi distinti dopo l'iniezione nel capillare dello strumento (15).

La sequenza nucleotidica fornita dallo strumento viene quindi comparata in banca dati con tutte le altre sequenze presenti; una banca dati di biosequenze ha la funzione di collezionare, annotare e distribuire sequenze nucleotidiche e proteiche con le relative informazioni descrittive inviate dagli autori direttamente alla banca, oppure estratte dai giornali scientifici sui quali è avvenuta la relativa pubblicazione.

Uno degli utilizzi più massicci delle banche dati riguarda l'applicazione dei metodi per la ricerca di omologie fra ceppi virali; il confronto delle sequenze dei frammenti ottenuti, con le sequenze presenti nelle banche dati, è eseguito con il programma BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tale programma effettua una comparazione tra una sequenza nucleotidica e un database di sequenze nucleotidiche, permettendo di risalire al genotipo dell'HPV d'interesse (17).

Deve essere comunque ricordato che la classificazione formale dei genotipi è interamente basata sull'analisi di sequenza del genoma virale, mentre la genotipizzazione dei campioni clinici è effettuata mediante l'analisi di una porzione limitata, ma rappresentativa, del genoma (16).

La determinazione della sequenza non è spesso agevole, soprattutto nel caso di campioni con infezioni multiple; le sequenze di quei genotipi che rappresentano le specie minoritarie nel campione, potrebbero essere non rivelate.

Questo potrebbe portare a sottostimare la prevalenza delle infezioni con HPV multipli, con importanti conseguenze negli studi di follow-up o nei futuri programmi di vaccinazione (18).

Questo problema è stato inoltre confermato in uno studio recente che ha comparato i risultati del sequenziamento dei prodotti di PCR, ottenuti con i *primer* SPF₁₀, con i risultati ottenuti con la metodica di ibridazione inversa degli stessi amplificati; tale analisi di sequenza è stata condotta su 166 campioni cervicali tutti positivi all'infezione da HPV e ha rivelato infezioni multiple solo nel 2% dei casi, mentre l'ibridazione inversa nel 25%(19).

La presenza di genotipi multipli è un fenomeno comune in molti pazienti; fino al 35% dei campioni HPV-positivi provenienti da pazienti con disordini citologici avanzati e più del 50% dei pazienti HIV-infetti contengono genotipi multipli, sembra invece che queste siano meno frequenti nei soggetti con carcinoma (20).

La Tipizzazione del DNA con microarray

Tra tutte le tecniche disponibili di genotipizzazione, quella che si sta affermando come una delle più interessanti ed innovative è il sistema dei chip a DNA (DNA Chip o microarray); i microarray consistono di biomolecole immobilizzate distribuite su di una superficie planare, microcanali o micropiastre.

In base alla tecnica di fabbricazione usata, i microarray planari possono essere largamente classificati in microarray preparati mediante sintesi in situ, originariamente sviluppati dalla Affymetrix (<http://www.affymetrix>).

com, Santa Clara, CA, USA), e quelli in cui si ha la diretta immobilizzazione delle biomolecole su vetro, membrana o altre superfici derivate, mediante la tecnica *microspotting* o a getto d'inchiostro (21).

Sono già disponibili diversi sistemi microarray per la genotipizzazione del papilloma virus, lo scopo che ora si prefiggono i ricercatori è quello di confrontare questi sistemi con quelli attualmente in commercio, per confermare o meno l'opportunità di utilizzare tali metodiche anche in ambito diagnostico (22, 23).

Un gruppo coreano ha realizzato un DNA chip capace di discriminare fino a 42 tipi virali diversi; in questo lavoro, il campione di DNA è prima amplificato con *primer* marcati per le regioni E6/E7, L1 e per il gene della beta globina umana come controllo, i prodotti di PCR sono applicati sul chip dove avviene la reazione di ibridazione con sonde oligonucleotidiche multiple della lunghezza di 18-25 bp.

Il genotipo di ciascun HPV è quindi identificato mediante uno scanner fluorescente e lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'utilità clinica di questo chip (GG HPVCHIP, Goodgene Inc., Seoul, Korea) comparando i risultati del microarray con quelli ottenuti sugli stessi campioni tramite sequenziamento del DNA; dei 100 campioni di cancro cervicale analizzati, 98 (98%) sono risultati tutti positivi all'infezione da HPV con genotipi ad alto rischio e 3 soli genotipi, HPV16, 31 e 58, rappresentavano la maggioranza (75,5%) di tutti gli HPV trovati.

I 98 campioni infetti sono stati quindi analizzati accuratamente tramite sequenziamento delle regioni E6/E7 ed L1 e tramite DNA chip, 88 campioni (89,8%) sono stati amplificati e sequenziati solo con i *primer* per la regione L1; tutti i genotipi identificati tramite sequenziamento sono stati identificati anche nel chip.

Entrambe le metodiche sono state capaci di discriminare tipi virali rari inclusi gli HPV26, HPV39, HPV51, HPV53 e HPV57 e il chip ha rivelato 7 casi di infezioni multiple, tra questi solo 1 è stato interpretato correttamente dalla tecnica del sequenziamento, gli altri 6 casi sono stati valutati erroneamente come infezioni singole; l'analisi della sola regione L1 ha fallito inoltre nell'identificare 9 genotipi, identificati però chiaramente dal chip (24).

Il gene E6 è una delle regioni più variabili del genoma dell'HPV16.

Inoltre, alcuni studi hanno fornito evidenze di un legame fra le varianti E6 del virus e la manifestazione clinica dell'infezione da HPV16 (25); per tale motivo, alcuni autori hanno focalizzato il loro interesse su questa regione virale realizzando un DNA chip (APEX, *array primer extension assay*) capace di rivelare i 28 diversi polimorfismi del papillomavirus 16 presenti nel solo gene E6.

I polimorfismi presi in considerazione erano solo quelli che determinavano una sostituzione aminoacidica della proteina, perché probabilmente capaci di avere un impatto biologico sulle proprietà della proteina stessa (26).

Per realizzare il chip, una serie di sonde oligonucleotidiche, che terminino una base prima del polimorfismo, sono state sintetizzate e individualizzate in doppio su di un vetrino; l'analisi è stata condotta su 12 campioni di cancro cervicale, tutti positivi all'infezione da HPV-16.

Dopo l'amplificazione dell'intero gene E6, i prodotti di PCR sono stati frammentati ed ibridizzati sul chip insieme ad una miscela contenente una polimerasi e ddNTP marcati con una sostanza fluorescente; ciascun campione ha quindi trovato sul chip il filamento complementare con cui appaiarsi.

La DNA polimerasi presente nella miscela, trovandosi in presenza di uno stampo di DNA e dei nucleotidi precursori, ha guidato quindi una normale reazione di allungamento, ma ha potuto incorporare solo un nucleotide, trattandosi di ddNTP, e proprio quel nucleotide specifico per un certo polimorfismo.

Il ddNTP fluorescente incorporato ha quindi permesso, dopo l'analisi del chip tramite scanner, di risalire alla sonda specifica con la quale il

campione aveva ibridato; conoscendo la disposizione delle sonde oligonucleotidiche sul chip è stato quindi possibile per gli autori determinare lo specifico polimorfismo.

Di dodici campioni testati, due avevano una sequenza identica a quella dell'HPV16 prototipo, otto portavano la variante 350G che determina la sostituzione leucina-valina alla posizione 83 ed una variante possedeva due polimorfismi 350G e 282T; tale chip propone qualcosa di nuovo rispetto ad altri sistemi miniaturizzati in quanto combina i vantaggi del metodo del sequenziamento di Sanger con le enormi potenzialità di un microarray (26).

CONCLUSIONI

Una grande varietà di tecniche è disponibile oggi per la rivelazione e la genotipizzazione dell'infezione da papillomavirus, ciò illustra il fatto che nessuna di queste fornisce la risoluzione definitiva e completa al problema.

E' oramai dimostrata la sensibilità maggiore nella ricerca del virus con tecniche biomolecolari rispetto alla citologia convenzionale, soprattutto nelle lesioni precancerose (27).

Le differenze tra tali tecniche si notano in particolare nella differente abilità di discriminare tra infezioni singole e multiple, e nella capacità limitata di individuare solo un certo numero di genotipi.

Tutto ciò giustifica lo sviluppo continuo di nuove metodiche, giacché, in base a studi epidemiologici e molecolari, è ormai ampiamente accertato che la varietà genomica di HPV può essere associata ad un potenziale oncogeno crescente (28).

I test tutt'ora in commercio godono certamente di una buona riproducibilità, bisogna però anche considerare la possibilità che gli amplificati di ciascun tipo virale possano essere classificati in modo errato (29).

Un'accurata genotipizzazione è essenziale per una adeguata classificazione dei pazienti in gruppi a basso ed alto rischio e l'analisi di sequenza del DNA fornisce certamente un approccio valido nell'identificazione virale; con tale metodica è possibile infatti determinare con precisione le differenti caratteristiche dei singoli HPV, rispetto invece all'analisi con sonda.

Il limite di tale tecnica comunque esiste e risiede nella possibilità di non valutare correttamente i casi di infezione multipla.

Nuovi sistemi di diagnosi come i microarray si stanno dimostrando accurati, efficienti e veloci strumenti per l'identificazione dei genotipi virali.

I chip possiedono dalla loro parte la capacità di determinare genotipi rari, genotipi con variazioni intrageniche di sequenza ed infezioni miste con più di un tipo virale; la rapidità d'esecuzione del test e la possibilità di analizzare molti campioni contemporaneamente sul un singolo chip, rendono certamente tale metodica la più promettente tra quelle disponibili.

BIBLIOGRAFIA

1. Meisels A, Fortin R, Roy M. *Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. Acta Cytol* 1976; 20:505-9
2. Kessler II. *Human cervical cancer as a venereal disease. Cancer Res* 1976; 36:783-91
3. Rotkin ID. *A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. Cancer Res* 1973; 33:1353-67
4. Naib ZM, Nahmias AJ, Josei WE. *Cytology and histopathology of cervical herpes simplex infection. Cancer* 1966; 19:1026-31
5. Bernard Hans-Ulrich. *The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol* 2005; 32S:S1-S6
6. Burd EM. *Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1):1-17
7. Broker TR. *Structure and genetic expression of papillomaviruses. Obstet Gynecol Clin North Amer* 1987; 14:329-48
8. Barbosa MS, Lowy DR, Schiller TJ. *Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. J Virol* 1989; 63:1404-7
9. Avvakumov N, Torchia J, Mymryk SJ. *Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. Oncogene* 2003; 22:3833-41
10. Cole ST, Danos O. *Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome: phylogeny of papillomaviruses and repeated structures of the E6 and E7 gene products. J Mol Biol* 1987; 193:599-608
11. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. *Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. J Virol* 2004; 78(21):11451-60

12. Andersson S, Safari H, Mints M, et al. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer* 2005; Jun 7.
13. Syrjanen K, Mantyjarvi R, Saarikoski S, et al. Factors associated with progression of cervical papillomavirus (HPV) infections into carcinoma in situ during a long term prospective follow-up. *Br J Obstet Gynecol* 1988; 95:1096-102
14. Calore E, Pereira M, Cavaliere MJ. Progression of cervical lesions in HIV-seropositive women: a cytological study. *Diagn Cytopathol* 2001; 24:117-9
15. Sato S, Maruta J, Konno R, et al. In situ detection of HPV in a cervical smear with in situ hybridization. *Acta Cytol* 1998; 42:1483-5
16. American Cancer Society (ACS). American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. Atlanta (GA): CA Cancer J Clin 2002; 52:342-62
17. Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-10
18. Kleter B, van Doorn Lj, Schrauwen L, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2508-17
19. Molijn A, Kleter B, Quint WGV, et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32S:S43-S51
20. Levi JE, Kleter B, Quint WGV, et al. High prevalence of human papillomavirus infections and high frequency of multiple genotypes in HIV-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol* 2002 ;40:3341-5
21. Venkatasubbarao S. Microarray – status and prospects. *TRENDS in Biotechnol* 2004; 22(12):630-7
22. Klaassen C, Prinsen C, de Valk H, et al. DNA Microarray Format for Detection and Subtyping of Human Papillomavirus. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5):2152-60
23. Yoo-Duk C, Woon-Won J, Jong-Hee N, et al. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA Chip and sequencing. *Gynecol Oncol* 2005; 98:369-75
24. Kim KH, Yoon MS, Na YJ, et al. Development and evaluation of a highly sensitive human papillomavirus genotyping DNA chip. *Gynecol Oncol* 2006; 100:38-43
25. Zehbe L, Wilander E, Delius H, et al. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 1998; 58:829-33
26. Gemignani F, Landi S, Chabrier A et al. Generation of a DNA microarray for determination of E6 natural variants of human papillomavirus type 16. *J Virol Meth* 2004; 119:95-102
27. Daniel RW, Ahdieh L, Hayden D et al. Intra-laboratory reproducibility of human papillomavirus identification in cervical specimens by a polymerase chain reaction-based assay. *J Clin Virol* 2000; 19:187-93
28. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(14):1072-9
29. Vernon SD, Unger ER, Williams D. Comparison of Human Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting, and Hybrid Capture. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2):651-5