

IMPATTO DELLE PATOLOGIE HPV CORRELATE IN ITALIA

Massimo Confortini

CSPO-Firenze

Indirizzo per corrispondenza: Dott. Massimo Confortini

CSPO

Via Cosimo Il Vecchio 2, 50139 Firenze (FI) Italia

tel: +39 055 32697863; fax: +39 055 32697863; e-mail: m.confortini@cspo.it

ABSTRACT

Cervical cancer represents worldwide an important health problem. In Italy, every year there are 3,500 new cervical cancers with 1,700 deaths. Cervical cancer is the first type of cancer totally connected to an infection. Now more than 100 HPV genotypes that infect human are known; of these 40 genotypes are associated with genital tract diseases. HPV types are classified in low risk and high risk HPV types. The knowing of the etiological role of HPV in the cervical carcinogenesis determined the introduction of molecular tests for the detection of high risk HPV. The actual screening programmes suggest the use of this test in the triage of borderline lesions and in the follow-up of CIN 2+ patients. An idea is to introduce the test as a primary screening for HPV diagnosis. The molecular tests have a good sensitivity, a good reproducibility over time and are strongly automated.

Key words: *citology; analytical*

RIASSUNTO

Il carcinoma della cervice uterina rappresenta a livello mondiale un importante problema sanitario. In Italia, i dati dei registri nazionali tumori relativi al 1998-2002 mostrano che ogni anno si hanno circa 3500 nuovi casi della cervice con circa 1700 morti. Il carcinoma cervicale è stato il primo cancro a essere riconosciuto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come totalmente riconducibile ad un'infezione. Ad oggi sono stati identificati più di 120 genotipi di HPV che infettano l'uomo dei quali circa 40 sono associati a patologie del tratto genitale, sia benigne che maligne. I diversi tipi di HPV sono infatti distinti in basso ed alto rischio oncogeno. Il ruolo eziologico dell'HPV rispetto alla comparsa dei tumori cervicali, il fatto che la totalità degli stessi è attribuibile a infezione da HPV e che la persistenza dell'infezione è necessaria per lo sviluppo delle lesioni intraepiteliali hanno suggerito l'applicazione di test molecolari per la ricerca di HPV ad alto rischio oncogeno in ambito di screening. Gli attuali protocolli di screening prevedono l'utilizzo del test nel triage delle diagnosi citologici borderline e nel follow-up delle pazienti trattate per CIN2+. Sono molto promettenti gli studi sul possibile utilizzo del test nello screening primario. Vi è inoltre da sottolineare che i test molecolari oggi disponibili hanno una sensibilità ottimale, sono riproducibili e fortemente automatizzati.

Parole chiave: *citologia; analitica*

INTRODUZIONE

Il carcinoma della cervice uterina rappresenta a livello mondiale un importante problema sanitario. E' infatti il secondo tumore maligno nella donna con circa 500.000 nuovi casi per anno dei quali l'80% nei paesi in via di sviluppo.

In Italia, i dati dei registri nazionali tumori relativi al 1998-2002 mostrano che ogni anno si hanno circa 3500 nuovi casi della cervice con circa 1700 morti.

Il carcinoma cervicale è stato il primo cancro a essere riconosciuto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come totalmente riconducibile ad un'infezione. Ad oggi sono stati identificati più di 120 genotipi di HPV che infettano l'uomo dei quali circa 40 sono associati a patologie del tratto genitale, sia benigne che maligne. I diversi tipi di HPV sono infatti distinti in basso ed alto rischio oncogeno. I genotipi a basso rischio sono associati a lesio-

ni benigne come i condilomi, mentre quelli ad alto rischio sono associati al cancro cervicale oltre ad altri tumori del tratto anogenitale come per esempio il carcinoma del pene, della vulva, della vagina e dell'ano.

La maggior parte delle infezioni è transitoria; il virus viene cioè eliminato dal sistema immunitario prima di produrre qualsiasi effetto patogeno. La persistenza dell'infezione è la condizione necessaria perché il virus espliciti un'azione trasformante sull'epitelio. I virus a maggior potere oncogeno sono quelli a maggior persistenza. In questo caso possono svilupparsi lesioni precancerose che possono progredire a cancro della cervice. La probabilità di progressione è legata ad una serie di fattori di rischio come l'elevato numero di partner sessuali, il fumo di sigaretta, l'uso prolungato di contraccettivi orali e co-infezioni con altri agenti sessualmente trasmessi.

La maggior parte delle giovani donne si infetta entro pochi anni

dall'inizio dell'attività sessuale; in uno studio italiano di grandi dimensioni (NTCC) su donne che partecipavano a programmi di screening la prevalenza di infezione genitale da HPV a rischio medio-alto è stata del 9% con una riduzione quasi lineare dal 16% per la fascia di 25-29 al 4,5% nella fascia 55-60. Dati di prevalenza al di sotto di questa fascia di età sono estremamente scarsi in Italia trattandosi di una popolazione in età non da screening. Alcuni dati preliminari di studi in corso indicano comunque una prevalenza di HPV nella fascia di età 18-25 estremamente alta.

Nello studio (NTCC) sopra ricordato si è inoltre evidenziato che la maggior parte delle donne portatrici di infezione non mostrava alterazioni citologiche. Le alterazioni citologiche borderline compaiono ad intervallo breve così come le lesioni di basso grado che in gran parte regrediscono.

La comparsa di lesioni di alto grado è stata relativamente rara e legata alla persistenza dell'infezione.

CICLO REPLICATIVO VIRALE E L'INTERAZIONE HPV-CELLULA

L'infezione ha generalmente inizio nelle cellule degli strati profondi dell'epitelio (cellule basali e parabasali) in quanto capaci di attività mitotica. La condizione necessaria perché si abbia una proliferazione del virus è l'accesso del virus agli epitelii capaci di riprodursi. Questo avviene attraverso microlesioni dell'epitelio che permettono al virus di arrivare agli strati più profondi.

L'interazione HPV-cellula realizza quindi quadri diversi in funzione del differente stato replicativo del virus. Inizialmente nelle cellule basali/ metaplastiche il virus va incontro ad una replicazione in forma episomale cioè presente come frammento extracromosomico di DNA circolare.

Questa forma di replicazione produce poche copie di DNA virale per cellula ospite; in alcuni casi il virione rimane funzionalmente inattivo. Le cellule che contengono poche copie di virus o il virus inattivo non mostrano nessuno dei classici segni delle modificazioni citopatiche presenti nella fase produttiva. Questa infezione viene definita latente; allo stato attuale non conosciamo per quanto tempo il virus possa mantenere questo stato e in che percentuale possa progredire ad infezione produttiva. Su questo passaggio influisce sicuramente lo stato immunologico dell'ospite. Si ha invece una infezione definita produttiva quando nella cellula infettata, definita "permissiva", il virus sintetizza il proprio DNA utilizzando l'apparato replicativo dell'ospite. Il virus penetra nel nucleo della cellula ospite, perde l'involucro capsidico e il suo DNA viene codificato per la sintesi dei messaggeri per la sintesi delle proteine precoci. Vi è inoltre una significativa produzione di proteine del capside. La formazione dei nuovi virioni viene completata negli strati superficiali dove il DNA si circolarizza e viene assemblato il capside. Nelle cellule permissive l'azione trasformante del virus non si traduce in un vero meccanismo oncogenico in quanto la cellula va in apoptosi (morte cellulare). E' questa la fase che è caratterizzata dalle tipiche lesioni produttive e modificazioni cellulari (coilocitosi) patognomoniche della lesione.

In condizioni particolari il genoma virale può integrarsi in quello della cellula ospite.

Nella cellula non permissiva il DNA virale si linearizza interrompendosi nella regione E2 ed integrandosi nel DNA della cellula ospite. In questa situazione gli oncogeni E6 ed E7 possono esplicare un'azione trasformante sulla cellula ospite che può dar origine a lesioni neoplastiche intraepiteliali e successivamente invasive.

LA DIAGNOSI CITOLOGICA DI INFEZIONI DA HPV

Le certezze sul ruolo eziologico di HPV ad alto rischio nella carcinogenesi dei tumori cervicali e anche le nuove conoscenze sull'interazione virus-cellula hanno trovato risposte nel nuovo sistema di refertazione di Bethesda (1988) e nei suoi successivi aggiornamenti (1999-2001).

In particolare la nuova classificazione delle lesioni intraepiteliali in basso ed alto grado ha tenuto ampiamente conto del ruolo dell'infezione virale nelle modificazioni cellulari. La suddivisione in lesioni intraepiteliali di basso (LSIL) ed alto grado (HSIL) si è basata non solo sulla consapevolezza della pessima riproducibilità della vecchia classificazione in displasie lievi, moderate e gravi ma anche su un nuovo concetto di sviluppo delle neoplasie cervicali. Mentre nel passato si è pensato al CIN come un continuum di lesioni intraepiteliali di sempre maggior gravità derivate da una matrice comune, l'introduzione della terminologia SIL presuppone l'identificazione di due entità LSIL ed HSIL diverse dal punto di vista eziologico, prognostico e terapeutico. Il TBS nelle varie riedizioni ha introdotto concetti estremamente innovativi come le atipie squamose di significato indeterminato (ASC-US) e le lesioni intraepiteliali. L'ASC-US identifica una miscelanea di quadri morfologici dubbi nei quali si pone un chiaro problema di diagnosi differenziale fra la negatività e la presenza di una lesione intraepiteliale che comprende anche una serie di modificazioni cellulari indicative ma non certe di una infezione da HPV. Il concetto di HSIL si basa su un meccanismo nel quale entrano in gioco gli oncogeni virali che guidano la proliferazione cellulare. Il controllo coordinato è perso. Tutto questo comporta modifiche cellulari nelle quali la mancanza di maturazione e il disordine della crescita si traduce in alterazioni cellulari definite come lesioni intraepiteliali di alto grado. In queste lesioni, di seguito descritte, non ritroviamo più i classici effetti citopatici, propri di una cellula apoptotica e quindi senza conseguenze cancerogene, ma ci troviamo di fronte ad alterazioni nucleari e di scarsa differenziazione che rappresentano un possibile step verso un processo invasivo tumorale.

Il concetto di LSIL presuppone una lesione dove l'espressione di E6 ed E7 è sotto controllo coordinato, la differenziazione dipende dall'espressione genica di HPV e la proliferazione è ancora confinata alla zona parabasale.

I quadri riferibili a SIL di basso grado comprendono anche i quadri tipici di una infezione da HPV (coilocitosi).

Nel TBS i quadri riferibili a CIN1 e ad un chiaro effetto citopatico da HPV, entrambi compresi nelle lesioni di basso grado (LSIL) sono così descritte:

Displasia lieve/CIN1

Il quadro è caratterizzato dalla presenza di cellule superficiali o intermedie con ingrandimento nucleare, rapporto N/C modificato, ipercromasia con forma nucleare rotonda od ovalare e membrana nucleare liscia. Differiscono dal coilocitosi per l'assenza dell'alone perinucleare. Presentano generalmente un citoplasma fine e trasparente ed un nucleo ingrandito (fino a 4-5 volte il nucleo di una cellula intermedia) con ipercromasia da lieve a marcata, un contorno nucleare generalmente rotondo o ovalare con talvolta lievi irregolarità nella forma. La cromatina è finemente o moderatamente granulare senza comunque assumere una disposizione fortemente irregolare con fenomeni di aree chiare o grossolanamente granulari.

Effetto citopatico da papilloma virus

Da oltre 30 anni, sulla base dei lavori di Meisels e Fortin e di Purolo e Savia, sono stati chiaramente identificati i criteri morfologici oggettivi che rappresentano la conseguenza di un'infezione da Papillomavirus.

Meisels e Fortin pubblicano nel 1976 uno studio in cui descrivono in modo chiaro i segni morfologici di una infezione da HPV. Partendo da numerose descrizioni riportate in letteratura talvolta confuse talvolta in contraddizione essi identificano due quadri principali legati a questa infezione.

1. Cellule isolate o più spesso in piccoli gruppi con citoplasma orangiofilo denso e nucleo fortemente ipercromico della grandezza di un nucleo di una cellula intermedia. Talvolta la forma di questi nuclei presenta lievi irregolarità. Queste cellule sono definite discheratociti.
2. Cellule intermedie, spesso di ampie dimensioni, contenenti uno o più nuclei ipercromati e leggermente irregolari. La cromatina è generalmente densa e talvolta grossolanamente granulare. Il nucleo è circondato da un'area chiara irregolare nel contorno. Il citoplasma è generalmente denso e spesso anfilo. Queste cellule sono state definite coilociti.

Il coilocita è la conseguenza di una infezione permissiva da HPV. La cellula mette in atto un meccanismo di apoptosi o morte cellulare. La zona chiara perinucleare rappresenta un'area necrotica alla periferia della quale si addensano fibrille citoplasmatiche residue. È stata in passato posta da alcuni autori la necessità di distinguere una lesione displastica da una chiara atipia coilocitica. L'ipotesi era che una diagnosi basata solo sulla presenza di cellule in apoptosi (coilociti) aveva una prognosi favorevole (senza una reale evoluzione cancerogena) e conseguentemente poteva avere un protocollo di approfondimento più leggero rispetto a reali lesioni displastiche. I risultati presentati in letteratura sottolineano la scarsa riproducibilità di una diagnosi specifica e conseguentemente sconsigliano una loro differenziazione. Inoltre questi due quadri, inseriti dal TBS 2001 nelle LSIL, possono essere presenti entrambi in uno striscio.

Una diagnosi citologica basata su questi quadri rientra quindi nella definizione data dal TBS nelle LSIL e dovrebbe essere fortemente indicativa della presenza di una lesione istologica CIN1.

In realtà una parte di queste diagnosi risulta negativa ai successivi accertamenti mentre una parte non trascurabile risulta una lesione istologica più grave CIN2+.

Anche se questi quadri hanno precisi criteri identificativi le discordanze fra la diagnosi citologica e i successivi approfondimenti possono essere dovuti ad una non completa valutazione di tutti gli elementi presenti.

Koss sottolinea che la presenza di una chiara atipia coilocitica può essere associata ad anomalie compatibili con lesioni di alto grado. La presenza di coilociti non deve far distogliere l'attenzione sulla presenza di eventuali cellule displastiche e sul loro grado di gravità.

Segni lievi da HPV

Se partiamo dai quadri sopra ricordati di un'infezione da HPV e cioè coilocitosi e discheratosi, inquadrati dal TBS nelle lesioni di basso grado, si deve anche essere consapevoli che la piena espressione di un effetto citopatico da virus non sempre viene espressa in uno striscio.

Questi due quadri così indicativi ed entrati da tempo nel patrimonio di esperienza di un citologo sono in alcuni casi più sfumati.

Lieve coilocitosi

Si possono ritrovare solo cellule con chiari aloni perinucleari ma senza atipia o cellule con lievi atipie nucleari talvolta multinucleazioni ed aloni perinucleari non chiaramente demarcati. Questi segni descritti in letteratura pongono il citologo davanti ad un evidente dubbio di diagnosi differenziale fra un processo reattivo ed una lesione intraepiteliale di basso grado.

Lieve discheratosi

Si tratta di cellule poligonali talvolta in miniatura con citoplasma orangiofilo e nuclei talvolta doppi ipercromici e leggermente irregolari. Quando rappresentano l'unica alterazione presente in uno striscio la diagnosi differenziale è fra un processo protettivo come la paracheratosi ed una displasia cheratinizzante (LSIL, HSIL).

In passato, successivamente ai lavori di Meisels e Coll. e di Purolo e Coll. sono stati pubblicati da Schneider e Coll. e da Tanaka e Coll. due lavori che cercavano di definire una serie di alterazioni cellulari indicative della possibile presenza di un'infezione da HPV. Fra questi si ricorda, oltre alla lieve coilocitosi e lieve discheratosi, la multinucleazione, la presenza di granuli intracitoplasmatici, la macrocitosi che rappresentano elementi estremamente aspecifici che rischiano di provocare una serie di diagnosi di atipia di bassissima predittività per una lesione intraepiteliale di basso grado.

Il razionale della divisione operata dal TBS in LSIL e SIL si basa sui limiti di riproducibilità della vecchia classificazione in displasia o CIN, sulle conoscenze ormai consolidate sul ruolo del papilloma virus e sul diverso tasso di progressione.

L'INTRODUZIONE DEI TEST MOLECOLARI PER LA RICERCA DI HPV AD ALTO RISCHIO ONCOGENO NEI PROGRAMMI DI SCREENING

Il ruolo eziologico dell'HPV rispetto alla comparsa dei tumori cervicali, il fatto che la totalità degli stessi è attribuibile a infezione da HPV e che la persistenza dell'infezione è necessaria per lo sviluppo delle lesioni intraepiteliali hanno suggerito l'applicazione di test molecolari per la ricerca di HPV ad alto rischio oncogeno in ambito di screening.

Sulla base di queste evidenze scientifiche il Ministero della salute ha modificato le linee guida sugli screening oncologici introducendo nei protocolli per la cervice uterina il test HPV. In particolare le nuove Linee guida prevedono l'utilizzo del test HPV nel triage delle diagnosi citologiche di ASC-US e nel monitoraggio delle pazienti post-trattamento. Ha inoltre sottolineato l'importanza di studi italiani (NTCC) per la possibile introduzione del test HPV come test di screening primario.

Il test HPV nel triage delle lesioni citologiche borderline

Una recente meta analisi (Arbyn et al 2006) ha confermato come il test HPV HR nel triage sia in grado di fornire una sensibilità comparabile a quella della colposcopia immediata nell'identificazione di lesioni Cin2+, riducendo il numero di donne inviate in colposcopia. Viceversa le donne che risultano negative al test sono a minimo rischio di lesioni Cin2+. Vi sono inoltre due importanti esperienze italiane (Carozzi et al 2005, Dalla Palma et al 2005) che dimostrano la validità del triage con HPV evidenziando inoltre

una bassa compliance alla ripetizione citologica.

I dati della survey del GISCI indicano che una donna con una citologia ASCUS ha una probabilità che varia dal 2% al 56% (valore medio 14%) di avere una lesione CIN2-3 istologica, mentre il rischio di carcinoma cervicale invasivo è basso (approssimativamente 0,1%-0,2%). Inoltre è noto che il risultato di ASCUS è poco riproducibile. Le recenti linee guida italiane prevedono tre possibili opzioni nel follow-up delle diagnosi di ASCUS quali: colposcopia immediata, ripetizione del pap test a specifici intervalli, HPV DNA test per i tipi ad alto rischio.

Numerosi studi hanno dimostrato una scarsa compliance delle pazienti alla ripetizione citologica. La conseguente scelta fra invio immediato in colposcopia o triage con test HPV si deve basare sui livelli organizzativi (carico di colposcopie, utilizzo di citologia in fase liquida) ma soprattutto sulla valutazione del valore predittivo positivo della classe ASC-US.

Il test HPV come indicatore di recidiva.

Le procedure escissionali o ablativo oggi utilizzate sono estremamente efficaci (>90%) nel trattamento delle lesioni CIN 2 o più gravi, anche se vi è una percentuale non trascurabile di recidive che necessitano di ulteriori terapie. Vi è inoltre da sottolineare che donne trattate per questo tipo di lesioni rimangono a maggior rischio per almeno 8 anni rispetto alla popolazione generale. Generalmente la sorveglianza di queste pazienti viene effettuata con la citologia e la colposcopia.

Numerosi studi hanno evidenziato che la persistenza del virus è predittiva di un rischio aumentato di possibile recidiva.

La possibile utilizzazione in questo ambito del test HPV, pur promettente, richiede una serie di valutazioni di costo efficacia.

HPV e screening primario

Numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato una sensibilità maggiore della ricerca del Virus Papilloma con tecniche biomolecolari nell'individuazione di lesioni pre-tumorali della cervice uterina, rispetto alla citologia convenzionale

Studi retrospettivi hanno inoltre messo in evidenza che l'infezione da HPV precede la comparsa di lesioni di alto grado di molti anni e che le donne HPV negative hanno un rischio ridotto di sviluppare tali lesioni per molto tempo.

Si può quindi ipotizzare che la ricerca dell'HPV come test primario di screening consenta un'anticipazione complessiva della diagnosi di alto grado e permetta di ottenere un migliore effetto protettivo anche con intervalli di screening più lunghi.

Il test HPV è inoltre ormai ampiamente standardizzato e consente di ottenere dati riproducibili.

Sono attualmente in corso in Europa alcuni trial prospettici al fine di valutare il possibile impiego del test HPV come test di screening primario.

Fra questi è in atto un trial multicentrico in Italia (NTCC). L'obiettivo dello studio è di valutare, in confronto alla citologia triennale convenzionale, la protezione fornita da uno screening basato sulla ricerca molecolare dell'HPV come unico test effettuato ad intervalli prolungati (5/6 anni) nelle donne negative, i costi in termini di numero e tipo di test necessari e gli effetti indesiderati di tale strategia. Lo studio intende inoltre definire per il test HPV l'età di inizio, le migliori condizioni di pratica e gli effetti indesiderati di tale strategia. I risultati fino ad oggi pubblicati, relativi alla fase di arruolamento, sono estremamente prometten-

ti ed indicano una maggior sensibilità del test HPV rispetto alla citologia convenzionale. Sono attesi entro la fine del 2008 i risultati del secondo round di screening al fine di valutare la possibile diminuzione delle lesioni cervicali nel braccio sperimentale che provverebbero una maggior protezione del test HPV rispetto alla citologia convenzionale.

TEST PER LA RICERCA DI PAPPILLOMAVIRUS

I test utilizzabili oggi per la ricerca e tipizzazione del virus Papilloma sono molteplici e con caratteristiche estremamente varie di complessità, sensibilità, specificità, costo, applicabilità su materiale biologico, livello di automazione ed accuratezza.

A grandi linee possiamo suddividerli sulla base di un approccio immunocitochimico e molecolare.

1. METODO IMMUNOCITOCHIMICO: prevede l'uso di anticorpi policlonali o monoclonali in grado di reagire con antigeni presenti nel capsido virale comuni a tutti i tipi di HPV. La metodica prevede l'utilizzo di materiale citologico fresco o fissato. I limiti di questa metodica che non ne hanno permesso un ampio utilizzo sono legati ad una sensibilità non ottimale nei casi in cui gli antigeni del capsido non sono espressi ed a problematiche intrinseche ad una eventuale tipizzazione, oggi parzialmente superate con l'introduzione in commercio di Ac in grado di riconoscere specifici sottotipi.
1. METODI MOLECOLARI: si basano su tecniche in grado di mettere in evidenza il DNA virale e possono fornire informazioni sulla presenza di HPV ad alto e basso rischio oncogenico e/o di uno specifico sottotipo. Diverse sono le tecniche utilizzabili e diversi sono i principi che stanno alla base della loro capacità di mettere in evidenza il virus:
 - Southern blot
 - Ibridazione in situ
 - Ibridazione in soluzione (Hybrid capture)
 - Amplificazione genica

Ai fini di una corretta scelta ed utilizzo delle tecniche biomolecolari devono essere presi in considerazione le caratteristiche del laboratorio in termini di competenze molecolari, spazi disponibili, attrezzature presenti, ma soprattutto le caratteristiche del test molecolare che riguardano:

1. Sensibilità e specificità
2. Accuratezza e riproducibilità
3. Possibilità di determinare un ampio spettro di HPV ad alto rischio oncogeno
4. Volume di attività/costi
5. Livello di automazione e standardizzazione del metodo
6. Quantità, stato di conservazione e tipo di campione
7. Controlli di qualità interni ed esterni

BIBLIOGRAFIA

1. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: A summary of meta-analyses. *Vaccine* 2006; Aug 21; 24 Suppl 3: S78-89
2. Bais, AG, Rebolj M, Snijders PJ, de Schipper FA, van der Meulen DA, Verheijen RH, Voorhorst F, van Ballegooyen M, Meijer CJ, Helmerhorst TJ. Triage using HPV-testing in persistent borderline and mildly dyskaryotic smears: Proposal for new guidelines. *Int J Cancer* 2005; 116: 122-9
3. Carozzi FM., Confortini M, Cecchini S, Bisanzi S, Cariaggi MP, Pontenani G, Raspollini MR, Sani C, Zappa M, Ciatto S. Triage with human papillomavirus testing of women with cytologic abnormalities prompting referral for colposcopy assessment. *Cancer* 2005, 105: 2-7
4. Carozzi F, Del Mistro A, Confortini M, Sani C, Puliti D, Trevisan R, De Marco L, Gillio Tos A, Girlando S, Dalla Palma P, Pellegrini A, Schiboni ML, Crucitti P, Pierotti P, Vignato A, Ronco G. Reproducibility of HPV DNA testing by Hybrid Capture 2 in a screening setting: Intralaboratory and Interlaboratory quality control in seven laboratories participating in the same Clinical Trial. *Am.J.Clin.Pathol.* 2005; 124: 1-6
5. Castle PE, Lorincz AT, Mielzynska-Lohnas I, Scott DR, Glass AG, Sherman ME, Schussler JE, Schiffman M. Results of human papillomavirus DNA testing with the hybrid capture 2 assay are reproducible. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1088-90
6. Chao A, Lin CT, Hsueh S, Chou HH, Chang TC, Chen MY, Lai CH. Usefulness of human papillomavirus testing in the follow-up of patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 1046-51
7. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PT, Ferreccio CT, Hieu NT, Matos E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjose S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJ, S. Franceschi. 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* 2005; 366: 991-8
8. Costa S, Syriänen K. Gestione delle pazienti con Pap test anormale Edizione Athena 2005. Volume 1
9. Dalla Palma P, Pojer A, and Girlando S. HPV triage of women with atypical squamous cells of undetermined significance: a 3-year experience in an Italian organized programme. *Cytopathology* 2005; 16: 22-6
10. Munoz N, F. Bosch X, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, PJ Snijders, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27
11. Ronco G, Segnan N, Giorgi-Rossi P, Zappa M, Casadei GP, Carozzi F et al. Human Papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the New Technologies for Cervical Cancer randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 765-74
12. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Dalla Palma P, Del Mistro A, De Marco L, et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology in primary screening of women younger than 35 years: results at recruitment for a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2006; 7: 547-55
13. Ronco G, Cuzick J, Segnan N, Brezzi S, Carozzi F, Folicaldi S, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, Giubilato P, Naldoni C, Polla E, Iossa A, Zorzi M, Confortini M, Giorgi-Rossi P and the NTCC working group. HPV triage for Low grade (L-SIL) cytology is appropriate for women over 35 in mass cervical cancer screening using liquid based cytology. *Europ J Cancer* 2007; 43: 476-80
14. Solomon D, Shiffmann M, Tarrone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance; baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 293-99
15. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute. Workshop. *Jama* 1988; 262: 931-4
16. Walboomers, JM., Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9