

CONFRONTO FRA TEST MOLECOLARI E ANALISI DELLA PRODUTTIVITA' DEL VIRUS DELL'HPV IN UNA POPOLAZIONE DI DONNE SALENTINE A RISCHIO

Andrea Tinelli, Giuseppe Leo^o, Maurizio Pisanò^o, Stefania Malerba^o,
Claudia Petrelli^o, Gabriele Capone^o

Unità Operativa di Ginecologia e Ostetricia, Ospedale Vito Fazzi, ASL Lecce, ^o Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LBMOS), Ospedale Vito Fazzi, ASL Lecce

Indirizzo per corrispondenza: Dott. Andrea Tinelli

U.O. Ginecologia e Ostetricia, Ospedale Vito Fazzi

P.zza Muratore 1, 73100 Lecce (Le) Italia

tel: +39 0832 661115; fax: +39 0832 661511; e-mail: andreatinelli@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: The HPV detection is by complex molecular methods, but the viral productivity can be detected only by messenger RNA individuation. **Material and methods:** we examined 140 women at risk for HPV infection, searching virus by REAL-TIME PCR, sequencing and molecular hybridization, classifying virus by genotype or genotypes in case of co-infections. To detect the viral oncogenicity we utilized a new test based on NASBA technology, the NucliSENS EasyQ, that highlights the mRNA presence in E6 and E7 regions. **Results:** on 52 samples HPV positive, 19 had one or more oncogenic genotypes of HPV (16, 18, 31, 33 e 45); comparison between genotypes detected by REAL TIME PCR and L1 gene hybridization (DNA test), by NASBA and mRNA hybridization and the genotypes detected by sequencing, promoted the DNA test as the most secure in genotyping detecting; on 15 samples of 19 the genotypes were correspondents, on 4 of 19 they were only partially and in 2 cases there was no correlation between the sequencing and the two methods. **Conclusion:** the contemporary detection of DNA and viral mRNA shows the presence of active infection, by onco proteins E6 and E7 persistence, who increase the oncogenic risk in women.

Key words: HPV, DNA, mRNA, cervical carcinoma, PCR; sequencing

RIASSUNTO

Introduzione: L'individuazione dell'HPV avviene con complesse metodiche molecolari, ma la produttività del virus può essere ricercata solo con l'individuazione dell'RNA messaggero. **Materiali e metodi:** abbiamo esaminato un gruppo di 140 donne a rischio per HPV, ricercando il virus con la REAL-TIME PCR, il sequenziamento e l'ibridazione molecolare, classificando i virus in base al genotipo o ai genotipi per le co-infezioni. Per rilevare l'oncogenicità del virus, abbiamo utilizzato un nuovo test basato sulla tecnologia NASBA, il NucliSENS EasyQ, che rileva la presenza dell'mRNA delle regioni virali E6 ed E7. **Risultati:** dei 52 campioni positivi all'HPV, 19 presentavano uno o più genotipi oncogeni di HPV (16, 18, 31, 33 e 45); il confronto fra i genotipi rilevati con REAL TIME PCR ed ibridazione del gene L1 (Test del DNA), quelli attraverso la NASBA ed l'ibridazione dell'mRNA e quelli rilevati col sequenziamento, ha promosso il test del DNA come più affidabile nel rilevare genotipi; in 15 campioni su 19 i genotipi erano corrispondenti, in 4 su 19, i campioni lo erano solo parzialmente e nei 2 casi restanti non c'è stata correlazione tra il sequenziamento e gli altri due metodi. **Conclusioni:** la rilevazione contemporanea sia del DNA che dell'mRNA virale indica la presenza di un'infezione attiva, con una produzione persistente delle oncoproteine E6 ed E7, che aumenta il rischio di oncogenicità.

Parole chiave: HPV, DNA, mRNA, cervicocarcinoma, PCR; sequenziamento

INTRODUZIONE

Il tumore della cervice è la conseguenza, nel 99,7% dei casi, di un'infezione persistente causata dal Papillomavirus e tra i vari genotipi, HPV-16 rappresenta il tipo virale più comunemente riscontrato (circa 50%), seguito da HPV-18 (15%), HPV-45 (8%) ed HPV-31 (5%). Dal punto di vista molecolare, gli HPV sono piccoli virus privi di *envelope*, che si replicano nel nucleo di cellule epiteliali squamose, hanno un piccolo diametro di circa 55 nm, un coefficiente di sedimentazione di 300 e possiedono un capsido icosaedrico composto da 72 capsomeri, che contengono almeno due proteine capsidiche: L1 ed L2. Ogni

capside virionico contiene, inoltre, numerose copie (circa 12) di L2 (70 kDa), la proteina minore del capsido.

Il genoma virale consiste di una singola molecola di DNA circolare double-stranded avente un peso molecolare (PM) di 7900 paia di di cui il 42% è formato da guanina e citosina; il DNA costituisce il 12% del peso del virione ed è associato a istoni cellulari, formando un complesso simile a cromatina. (1)

Gli HPV vengono classificati in tipi, sottotipi e varianti dello stesso subtipo a seconda della somiglianza della sequenza dei loro geni L1: un nuovo tipo di HPV è classificato come tale se la sequenza del gene L1 differisce di almeno il 10% da quella di un altro tipo, mentre si

tratta di un sottotipo o di una variante se la differenza è, rispettivamente, del 2-10% e del 2%.

In base al loro potenziale oncogeno è possibile suddividere i virus in categorie di rischio differenti: i genotipi 31, 33, 35, 51 e 52 sono indicati come genotipi a "rischio intermedio", in quanto risultano più comuni nelle displasie leggere più che nei carcinomi.

Tra i genotipi ad alto rischio quelli prevalentemente associati al carcinoma cervicale sono il 16 ed il 18: il DNA dell'HPV 16 è stato riscontrato in oltre il 50% dei carcinomi cellulari squamosi, mentre il DNA dell'HPV 18 è stato trovato in più del 50% degli adenocarcinomi. (2) Tornando alle caratteristiche genetiche dell'HPV, una caratteristica comune dei diversi sottotipi di HPV è la presenza di un genoma formato da otto sequenze codificanti denominate ORF (ovvero OPEN READING FRAMES), o "quadri di lettura aperta", che rappresentano tratti del genoma potenzialmente trascrizionali ossia ciascuno capace di codificare per uno specifico mRNA e proteina relativa e rappresentano l'85% del DNA virale.

Gli ORF degli HPV sono suddivisi in regioni precoci (denominate E, cioè "early", che costituiscono oltre il 50% del genoma virale) e tardive (definite L, ovvero "late", rappresentanti il 40% del genoma virale); tali regioni codificano rispettivamente per proteine precoci (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8) e tardive (L1, L2). I geni E3 ed E8 non presentano una funzione chiaramente definita. (3)

Come gli herpesvirus e gli adenovirus, gli HPV possono utilizzare per la trascrizione le RNA polimerasi DNA-dipendenti della cellula e pertanto devono iniziare la trascrizione nel nucleo della cellula ospite, dove si trovano gli enzimi necessari.

Per tale motivo, la presenza di mRNA nell'analisi dei campioni permette di individuare la presenza del virus integrato nella cellula ospite e quindi la produttività virale. (4)

Le tecniche che vengono comunemente utilizzate per la diagnosi di un'infezione da HPV sono rappresentate in un primo momento dall'esame citologico (Pap-test) e quello istologico (colposcopia e biopsia) e, in un secondo momento, da tecniche più precise, rappresentate da esami di biologia molecolare, quali la REAL-TIME PCR, ibridazione molecolare e sequenziamento del DNA, che consentono di rilevare con maggiore accuratezza la presenza di un'infezione virale produttiva, di identificare e classificare in alto o basso rischio il genotipo responsabile e valutare l'eventuale presenza di una co-infezione (determinata da due o più genotipi virali). (5)

I test basati sulla rilevazione del DNA del virus non sono, quindi, i più adeguati per prevedere l'insorgenza di un cervico-carcinoma, in quanto essi rilevano esclusivamente la presenza del DNA virale, ma non l'attività oncogenica. (6)

Per questo motivo, sono stati introdotti recentemente sul mercato dei test per la rilevazione dell'mRNA delle regioni E6 ed E7 di alcuni genotipi oncogeni di HPV.

Il test mRNA-HPV è molto sensibile ed è in grado di rilevare le infezioni allo stadio iniziale, molto prima che le modificazioni cellulari siano visibili in un normale campione di cellule studiato al microscopio. (7)

In questo lavoro gli autori hanno valutato l'eventuale positività all'infezione virale utilizzando tecniche di biologia molecolare differenti, al fine di classificare correttamente i genotipi a rischio, utilizzando 3 tecniche diagnostiche: sonde di DNA, sequenziamento ed espressione dell'RNA messaggero.

Il primo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di determinare la presenza del virus dell'HPV in un gruppo di donne salentine a rischio; nelle pazienti positive, è stato ricercato il genotipo mediante l'utilizzo del sequenziamento e dell'ibridazione molecolare, in modo tale da poterlo classificare correttamente in alto o basso rischio ed

eventualmente valutare la presenza di co-infezioni

Infine, nelle pazienti con infezione da genotipi di HPV ad alto rischio, in particolare HPV 16, 18, 31, 33 e 45, gli autori dello studio ha determinato la produttività del virus attraverso l'impiego di un nuovo test, basato sulla tecnologia NASBA, che consente di determinare l'attività oncogenica di tali genotipi, rilevando la presenza dell'mRNA delle regioni E6 ed E7.

MATERIALI E METODI

Un gruppo di donne afferenti al Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LBMOS), dell'Ospedale "Vito Fazzi" di Lecce, per sospetta infezione da HPV, sono state sottoposte, mediante analisi del muco cervico-vaginale raccolto con *scrape cervicale*, a ricerca dell'HPV. IN 140 campioni inviati abbiamo ricercato, mediante l'amplificazione di una specifica sequenza del genoma virale, l'ORF L1, la presenza di genotipi di HPV.

L'amplificazione della sequenza L1 (Test DNA-HPV L1), è stata effettuata attraverso l'impiego della tecnologia REAL-TIME PCR, utilizzando i primers MY09 e MY11 diretti verso una regione di 450bp all'interno dell'ORF L1, e la molecola fluorescente SYBER Green.

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

Attraverso l'analisi della Temperatura di melting (T_m), è stato possibile operare una classificazione indicativa tra genotipi di HPV; la Temperatura di melting (temperatura alla quale il 50% del DNA di un organismo risulta denaturato) dipende, infatti, dalla percentuale delle basi Guanina e Citosina presenti nel filamento target ed i diversi genotipi di HPV differiscono tra di loro proprio per quanto riguarda la composizione in basi dello specifico filamento di DNA.

Per poter classificare l'HPV come basso medio ed alto rischio di trasformazione neoplastica, abbiamo utilizzato due tecnologie diagnostiche molto specifiche e sensibili, quali il *sequenziamento* ed il *test di ibridazione molecolare* (test di tipizzazione molecolare).

Il sequenziamento si basa sull'analisi della sequenza nucleotidica (ovvero, la lettura di ogni singola base) del filamento di DNA di ogni specifico genotipo dell'HPV.

Nelle pazienti risultate positive all'HPV, con l'identificazione del genotipo di HPV responsabile dell'infezione, mediante l'utilizzo di una tecnica che sfrutta il principio dell'ibridazione dei prodotti di amplificazione con 37 sonde oligonucleotidiche, specifiche per altrettanti genotipi di HPV.

Infine, la presenza dell'mRNA delle regioni E6 ed E7 è stata rilevata attraverso l'impiego di un nuovo test (NucliSENS EasyQ), basato sulla metodica NASBA, che permette di determinare l'attività oncogenica di quei 5 genotipi di HPV ad alto rischio ai quali è stata rivolta la nostra attenzione.

I risultati ottenuti con la metodica NASBA sono stati comparati con quelli ottenuti attraverso il test del DNA e quelli ottenuti con il sequenziamento.

RISULTATI

52 campioni su 140 sono risultati essere risultati positivi all'HPV (37.1%) e di questi, 19 (36%) presentavano uno o più di uno dei cinque genotipi oncogeni di HPV (HPV 16, 18, 31, 33 e 45).

Su tali campioni si è andati a valutare l'espressione delle oncoproteine virali E6 ed E7 che sono determinanti nel processo di trasformazione neoplastica; i casi positivi a quest'ultimo test hanno permesso d'individuare le infezioni virali produttive e quindi i virus non quiescenti, in grado di produrre le oncoproteine trasformanti E6 ed E7.

L'analisi del confronto fra i risultati della ricerca dei vari genotipi rilevati attraverso amplificazione ed ibridazione del gene L1 (Test DNA-

HPV L1), quelli rilevati attraverso amplificazione (NASBA) ed ibridazione dell' mRNA dei geni E6/E7 e i genotipi rilevati attraverso il sequenziamento, ha permesso di rilevare come il test del DNA abbia rilevato un numero di genotipi maggiore rispetto a quelli evidenziati con il test dell'mRNA-HPV e con il sequenziamento.

L'analisi di tutti i casi di concordanza da infezione singola (mono infezione) da HPV, ottenuti dal confronto tra il singolo genotipo identificato mediante sequenziamento molecolare e quello corrispondente rilevato attraverso l'uso di apposite sonde molecolari ha fornito un risultato concordante nel 90% dei casi e discordante solo nel 10%.

Analizzando i casi sospetti per co-infezione o infezione mista, non abbiamo ottenuto gli stessi risultati, in quanto il singolo genotipo ottenuto mediante la tecnica del sequenziamento non è stato confermato dall'utilizzo di specifiche sonde molecolari, che invece hanno evidenziato in tutti i casi la presenza di un'infezione mista.

Esaminando il rapporto tra casi totali di concordanza e quelli di discordanza ottenuti dall'analisi combinata dei differenti genotipi di HPV attraverso il sequenziamento e l'utilizzo di specifiche sonde molecolari, nel 10% dei casi non c'è correlazione tra i risultati ottenuti con la tecnica del sequenziamento e l'utilizzo di specifiche sonde molecolari, mentre nel 90% dei casi le due tecniche utilizzate hanno riportato gli stessi risultati (Figura 1).

Con l'analisi combinata con sequenziamento e ibridazione con sonde oligonucleotidiche (test di tipizzazione molecolare), abbiamo tipizzato con notevole precisione le infezioni singole e multiple da HPV, anche se, tuttavia, la comparazione fra le due tecniche ha promosso la prima come la tecnica maggiormente affidabile e precisa.

Il Test DNA-HPV L1 si avvale dell'utilizzo di sonde specifiche per 37 diversi genotipi del virus, mentre il NucliSENS EasyQ utilizza delle sonde dirette verso l'mRNA delle regioni E6 ed E7 solo di 5 genotipi di HPV ad alto rischio.

Inoltre per 15 campioni, dei 19 esaminati (che presentavano uno o più di uno dei cinque genotipi oncogeni di HPV), i risultati ottenuti per mezzo dei tre differenti metodi di rilevazione sono stati corrispondenti.

Per i restanti 4 campioni su 19 oncogeni, è stato possibile notare una corrispondenza solo parziale, nel senso che, per alcuni genotipi, la corrispondenza si osservava tra il metodo di rilevazione con il test del DNA e quello del NASBA, per altri la corrispondenza si osservava invece tra quei genotipi ottenuti con il test del DNA e con quelli del sequenziamento.

Nei due casi in cui non c'è stata correlazione tra il sequenziamento e gli altri due metodi, sarebbe opportuno studiare le sequenze per individuare eventuali variazioni che possano giustificare questi risultati inattesi.

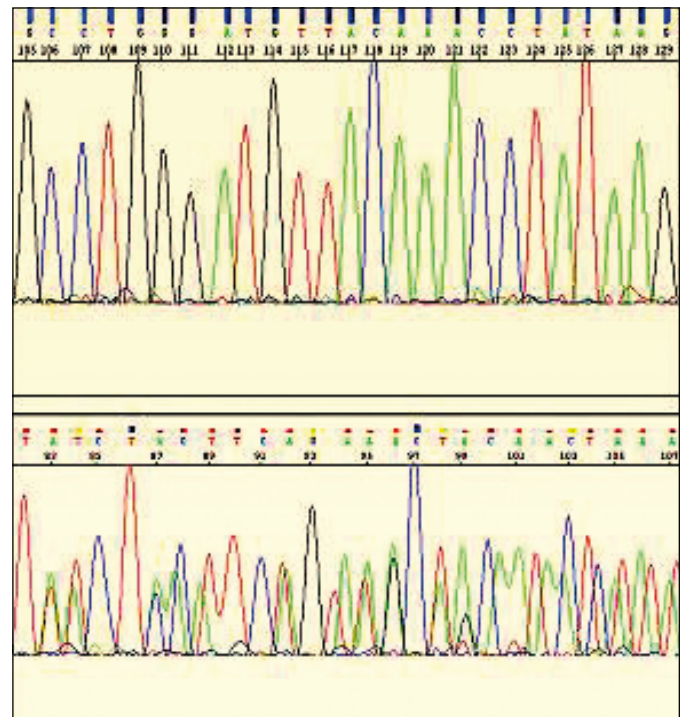
DISCUSSIONE

A causa della sua stretta correlazione con il cervicocarcinoma, la ricerca dell'HPV è sempre più richiesta nei laboratori; nonostante il Pap-test sia uno dei test di screening più diffusi e a basso costo, la sua importanza come test predittivo tende a ridursi, pur rimanendo fondamentale nel monitoraggio del grado della lesione cellulare e, quindi, dell'evoluzione della patologia precancerosa.

Negli ultimi anni i test di biologia molecolare sono entrati a far parte della diagnosi di routine delle infezioni da HPV e, fra questi, la REAL-TIME PCR, l'ibridazione molecolare ed il sequenziamento del DNA hanno tutti permesso un aumento della sensibilità e specificità, con una rapida ed accurata identificazione dei genotipi di HPV responsabili dell'infezione virale, mediante individuazione dell'ORF L1 del genoma del virus.

Tale regione genomica è di fondamentale importanza nella ricerca del virus in quanto, in caso di delezione anche soltanto parziale, maschererebbe la ricerca dell'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite.

Figura 1. Esempi di spettri di sequenziamento (elettroferogrammi) di HPV in caso di infezione singola (in alto) e multipla (in basso). Nella figura in alto, viene rappresentato un campione avente una singola infezione da HPV, mentre in quella in basso si riscontra un'infezione multipla (ovvero, caratterizzata dalla presenza di genotipi differenti di HPV).



Dal confronto fra le tecniche, è emerso che il sequenziamento molecolare dell'HPV, che rappresenta un mezzo diagnostico altamente significativo per distinguere l'infezione da HPV causata da un singolo genotipo rispetto a quella multipla, è maggiormente specifico rispetto all'ibridazione con sonde oligonucleotidiche nell'individuare ed interpretare i casi di co-infezione da HPV.

Considerando i casi di mono-infezione, nel confronto tra il numero delle singole infezioni evidenziate mediante la tecnica del sequenziamento e quelle ottenute con l'utilizzo delle sonde molecolari, i risultati, come detto, sono stati concordi nel 90% dei casi, mentre solo nel 10% dei casi è stato riscontrato un risultato discordante.

Tale comparazione permette di definire come "affidabile" l'utilizzo delle sonde nei casi di mono-infezione da HPV, anche se appare quanto meno discutibile la scelta della metodica come screening, visto che non ci è dato di sapere se una donna abbia o meno un solo genotipo di HPV, prima di studiarla con analisi molecolare. (8)

Analizzando ancora i risultati ottenuti nel nostro studio è stato possibile osservare come sia necessario utilizzare le tecniche in parallelo, ovvero sia la REAL-TIME PCR e il sequenziamento del filamento di HPV DNA, attraverso ibridazione con sonde specifiche, al fine di ottenere e di identificare, con più precisione possibile, il genotipo di HPV responsabile dell'infezione.

La comparazione fra le due tecniche, il sequenziamento e l'ibridazione molecolare, ha promosso la prima come la tecnica maggiormente affidabile e precisa e, quindi, "Gold Standard" nell'individuare eventuali episodi di co-infezione da due o più genotipi differenti.

Il sequenziamento molecolare dell'HPV rappresenta l'unica metodica capace di determinare l'effettiva sequenza nucleotidica del filamento di DNA virale con l'analisi di ogni singola base e, al tempo stesso, diagnostica la possibile infezione multipla da HPV, in grado di dettagliare

la presenza di uno o più genotipi di HPV in contemporanea. Inoltre il sequenziamento è un mezzo molto valido per capire l'effettiva presenza o meno di uno o più genotipi virali, poiché mostra spettri di segnali inequivocabili che ci consentono di distinguere tra mono e co-infezione.

Il test d'ibridazione molecolare, invece, sfrutta il principio dell'ibridazione dei prodotti di amplificazione con delle particolari sonde oligonucleotidiche specifiche per i singoli genotipi di HPV. (9)

Il test del DNA si avvale, come detto, dell'utilizzo di sonde specifiche vs DNA per 37 diversi genotipi del virus, a differenza della seconda che utilizza delle sonde vs mRNA delle regioni E6 ed E7 di soli 5 genotipi di HPV ad alto rischio e del sequenziamento la cui capacità di rilevazione è limitata ad un singolo genotipo o al massimo alla presenza di eventuale co-infezione.

L'applicazione contemporanea del sequenziamento e delle sonde molecolari permette di eseguire una diagnosi corretta di una eventuale co-infezione, spesso non diagnosticabile con le sole sonde molecolari, per specificare, per quanto possibile, i genotipi coinvolti.

Discutendo ancora sulle capacità oncogene dell'HPV, in letteratura è possibile sottolineare come all'elevata prevalenza di soggetti positivi al test DNA-HPV, però, non corrisponda la bassa incidenza neoplastica genitale.

È stato difatti visto che non è l'intero virus ad avere un ruolo attivo nel processo di carcinogenesi, lo sono in particolare delle oncoproteine virali E6 ed E7, in quanto la loro presenza è legata alla trasformazione neoplastica.

I prodotti genici di E6 ed E7 sono in grado, in maniera indipendente, di immortalizzare vari tipi di cellule umane in colture tissutali, ma l'efficienza aumenta quando essi sono espressi simultaneamente: essi deregolano il ciclo cellulare legando ed inattivando le proteine di soppressione tumorale (p53 ed Rb), le cicline cellulari e le chinasi ciclina-dipendenti. (10)

I test per la rilevazione del DNA dell'HPV permettono la rivelazione della presenza di un'infezione virale, ma non forniscono informazioni circa l'espressione delle oncoproteine virali e quindi la persistenza dell'infezione virale e la sua evoluzione verso un cancro cervicale e, inoltre, il test DNA-HPV potrebbe fornire, in alcuni casi, dei falsi negativi. (11)

Il test mRNA-HPV è molto sensibile ed è quindi in grado di rilevare le infezioni allo stadio iniziale, molto prima che le modificazioni cellulari siano visibili in un normale campione di cellule studiato al microscopio. Nell'analisi dei risultati, abbiamo posto particolare attenzione su quei campioni risultati positivi ai 5 genotipi ad alto rischio, in cui è stato

eseguito il test mRNA-HPV; l'impiego di tale test NASBA ha consentito d'individuare quali, tra le infezioni risultate positive al test DNA, fossero infezioni virali attive o produttive.

Poiché la maggior parte delle infezioni da HPV è transitoria, è, quindi, importante sia determinare la persistenza di una infezione da HPV, che esprime proteine trasformanti, quali le E6 ed E7, oltre che accertare la presenza di un fattore di rischio di trasformazione neoplastica (presenza di mRNA-HPV), in uno stadio molto precoce quando non sono ancora evidenti le lesioni citologiche (coilociti).

Riteniamo che i test per la determinazione della presenza del DNA virale e quello per la determinazione della presenza dei trascritti delle regioni E6/E7 (mRNA) dovrebbero essere condotti contemporaneamente, soprattutto in presenza di lesioni citologiche sospette per possibile trasformazione neoplastica

CONCLUSIONI

Essendo la valutazione biologica molecolare l'esame che attualmente riveste un'importanza significativa, sia nel diagnosticare l'effettiva presenza dell'HPV, sia nell'indicare lo specifico genotipo responsabile dell'infezione, sia nel fornire informazioni su possibili co-infezioni da HPV, non è più possibile parlare del test che individua l'HPV in termini approssimativi.

L'attività dell'HPV nell'organismo umano è identificabile mediante la ricerca dell'mRNA delle regioni E6/E7 dei principali tipi oncogeni dell'HPV ad alto rischio, marcatori di un'infezione virale attiva; la metodica NASBA permettendo l'identificazione del reale genotipo responsabile dell'infezione, oltre che la ricerca dell'HPV-mRNA delle regioni E6 ed E7, evidenzia il ruolo di importante innovazione di tale test sia nell'ambito della diagnosi di laboratorio che del monitoraggio della progressione dell'infezione virale.

La rilevazione contemporanea sia dell'HPV-DNA virale che del suo mRNA indica la presenza di un'infezione attiva, con una produzione persistente delle oncoproteine E6 ed E7, che aumenta il rischio di trasformazione cellulare verso il cancro alla cervice uterina.

Per quanto riguarda i casi discordanti, per cui è stata evidenziata la presenza del DNA virale di un genotipo oncogeno ma non il corrispondente mRNA, possiamo affermare che si tratta di un'infezione virale probabilmente non produttiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Tinelli A, Vergara D, Leo G et al. Approccio biomolecolare nella diagnostica dell'hpv: il ruolo delle nuove tecnologie nello studio dell'HPV-DNA. *attualità e prospettive. La Rivista Italiana di Ostetricia e Ginecologia* 2006; 12(3):597-604.
2. Tinelli A, Leo G, Guglielmo I, Pisanò M, Storelli F, Pitotti E, Galante MM, Vergara D, Tinelli R, Malvasi A, Guido M. *Epidemiologia molecolare sull'HPV in una popolazione salentina a rischio nell'ultimo biennio. Rivista di Ostetricia, Ginecologia pratica e Medicina Perinatale* 2008; 23(2): 25-28.
3. Tinelli A, Vergara D, Leo G et al. *Human papillomavirus genital infection in modern gynaecology: genetic and genomic aspects. Eur Clinics Obstet Gynaecol* 2007; 3:1-6.
4. Kraus I, Molden T, Holm R, Lie AK, Karlsen F, Kristensen GB, Skomedal H. *Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. J Clin Microbiol.* 2006 Apr;44(4):1310-7.
5. Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrøm T, Karlsen F. *PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. J Virol Methods.* 2007 Jun;142(1-2):204-12.
6. Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H and Hagmar B. *HPV E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age, Gynecol Oncol* 2006; 100:95-100.
7. Lie AK, Kristensen G. *Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as predictive marker for cervical carcinoma. Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8: 405-15.
8. Seme K, Fujs K, Kocjan BJ, Poljak M. *Resolving repeatedly borderline results of Hybrid Capture 2 HPV DNA Test using polymerase chain reaction and genotyping. J Virol Meth* 2006; 134:252-256.
9. Lie AK, Risberg B, Borge B, Sandstad B, Delabie J, Rimala R, Onsrud M and Thoresen S. *DNA-versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. Gynecol Oncol* 2005; 97: 908-15.
10. Giles M, Garland S. *A study of women's knowledge regarding human papillomavirus infection, cervical cancer and human papillomavirus vaccines. Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006 Aug;46(4):311-5.
11. Draganov P, Todorov S, Todorov I, Karchev T, Kalvatchev Z. *Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis using Sybr Green real-time PCR. Int J Ped Otorhin* 2006; 70: 469-73.