



Infezioni cervicali da genotipi multipli di Human Papillomavirus: prevalenza ed impatto sul rischio di lesioni cervicali intraepiteliali

Graia S.¹, Canipari C.², Daccò M.D.¹, Gardella B.¹, Spinillo A.¹

¹*Clinica Ostetrico-Ginecologica e* ²*Oncologia Medica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

INTRODUZIONE

Una larga parte delle infezioni da *Human Papillomavirus* (HPV) è sostenuta da genotipi multipli. L'effetto di infezioni multiple sul rischio di neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN) e l'efficacia potenziale del vaccino su queste infezioni sono controversi. Noi abbiamo effettuato una tipizzazione virale con SFP10-LIPA su un campione di 1323 donne che si sono sottoposte a colposcopia, 69% delle quali aveva ricevuto una biopsia cervicale, e abbiamo correlato la severità della CIN con il tipo ed il numero di HPV.

L'infezione da HPV ha un ruolo centrale nell'eziologia della neoplasia cervicale e nelle sue lesioni precancerose [1].

Queste sono sostenute da una gamma molto svariata di genotipi virali che differiscono in potenziale oncogeno, preferenza tissutale, distribuzione geografica ed anagrafica e tassi di risoluzione o persistenza [2]. L'avvento di

vaccini genotipo-specifici multivalenti ha consolidato la conoscenza della distribuzione dei genotipi di HPV nella popolazione bersaglio e la valida comprensione delle dinamiche dell'infezione che potrebbe comparire come una conseguenza della cross-protezione o della competizione tra genotipi [3].

Considerato il numero di fattori che può influenzare la distribuzione dei genotipi di HPV [2], i risultati provenienti da studi differenti non possono essere generalizzati dal momento che essi dipendono largamente dallo studio, dalla popolazione bersaglio, dal tipo di obiettivo e dal metodo di tipizzazione di HPV; più specificatamente, risultati controversi sono stati riportati sull'epidemiologia molecolare e la rilevanza clinica delle infezioni da multipli genotipi di HPV.

Noi abbiamo sistematicamente operato una tipizzazione di HPV con SFP10-LIPA [4], un metodo efficace e sensibile per la scoperta simultanea di multipli genotipi di HPV, in donne che si sono sottoposte a colposcopia in un ospedale di riferimento di terzo livello.

Il nostro studio si è basato su un campione di 1323 donne osservate in un periodo di tempo di 3 anni.

Scopi primari dello studio erano la valutazione della distribuzione dei genotipi di HPV nella nostra area e la correlazione della severità delle lesioni cervicali con il tipo e il numero delle infezioni da HPV.

Dal momento che la vaccinazione per l'HPV su larga scala è imminente in Italia, studi sulla distribuzione dei tipi di HPV forniscono la base per la sorveglianza post-vaccinazione sulla circolazione di genotipi virali e sulle loro correlazioni cliniche [5].

MATERIALI E METODI

La popolazione dello studio é costituita da donne che si sono sottoposte a colposcopia presso la Clinica Ostetrico-Ginecologica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia in un periodo di 3 anni (2005-2007). Le principali indicazioni per l'esame colposcopico erano il riscontro di anomalie all'esito del Pap-test (80%), una storia precedente di lesione squamosa intraepiteliale (SIL)/neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN) (6.6%), sospetta o manifesta condilomatosi vulvovaginale (5.5%) e una storia di vulvodinia (3.1%).

Durante il periodo di studio tra le 1406 pazienti rivoltesi alla Nostra Clinica per la colposcopia, 83 (0.6%) hanno avuto un campionamento per HPV-DNA insoddisfacente e sono state escluse dallo studio.

Le principali caratteristiche demografiche delle 1323 donne eleggibili per lo studio e gli esiti dei Pap-test precedenti l'esame colposcopio sono riportati in tabella 1. L'età media delle pazienti era di 36.6 ± 10.7 anni e il 92% di loro erano italiane. L'esame citologico era disponibile per tutte le donne e riportato in accordo con la classificazione Bethesda del 2001 [6]. L'esame citologico é stato interpretato da medici di riferimento e non é stato esaminato istituzionalmente.

I campioni cervicali per tipizzazione virale sono stati ottenuti prima dell'esame colposcopico. Una volta posizionato lo *speculum*, si procedeva al prelievo di secrezioni cervico-vaginali che si ponevano nel terreno di trasporto *ThinPrep-PreservCyt Solution* conservato a 4°C. L'estrazione del DNA dal campione é stata effettuata entro una settimana e avveniva tramite la lisi e la digestione con proteinasi K.

Lo studio é stato approvato dal Comitato Etico locale. Il consenso informato per il test dell'HPV é stato ottenuto da tutti i soggetti.

Brevemente, le cellule sono state lavate con 1.5 ml di soluzione di *PreservCyt* in PBS e risospese in 100 µl di soluzione litica (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.3, MgCl₂ 2.5 mM, Tween 20 0.45%, NP40 0.45%, proteinasi K 500 mg/ml) a 56°C per 1 ora. In seguito all'inattivazione al calore della proteinasi K, 10 µl della soluzione sono stati usati per l'amplificazione con PCR delle sequenze di HPV dalla regione L1 utilizzando SF10 *primers* in un volume di reazione finale di 50 µl per 40 cicli. Controlli positivi e negativi sono stati introdotti in ciascun set di 12 reazioni, queste includevano DNA da linee cellulari Siha e HeLa ad uno specifico numero di copie di HPV e campioni privi di cellule per tutta la durata della procedura. Una contemporanea amplificazione delle sequenze di beta-globina é stata compiuta per controllare l'adeguatezza del DNA.

I genotipi specifici HPV sono stati individuati da una sonda lineare, con il metodo di genotipizzazione INNO-LiPA HPV in accordo con le istruzioni del produttore. L'attuale versione del test permette la simultanea e distinta individuazione di 15 genotipi ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70), e a basso rischio (6, 11, 34, 40, 42-44, 53, 54 e 74). I pattern di ibridazione sono stati interpretati da due lettori indipendenti; interpretazioni discrepanti sono state rare ed usualmente risolte con una lettura consensuale o, occasionalmente, grazie ad un terzo lettore.

Successivamente al Pap-test, é stato eseguito un esame colposcopio del basso tratto genitale standardizzato entro 3 settimane dalla diagnosi citologica. Sono state ottenute biopsie mirate, quando giudicato necessario dai medici che eseguivano l'esame colposcopio, nel 69.5% (919/1323) delle

donne. Le biopsie sono state routinariamente processate secondo il protocollo standard, colorate con ematossilina-eosina (EE) ed esaminate a più livelli; in casi selezionati, sono stati utilizzati test immunohistochimici ancillari per Ki67 e p16INK4a. Una resezione della zona di trasformazione è stata ottenuta mediante la procedura *large loop excision* (LEEP) in 298 donne e mediante escissione a lama fredda in 42 donne entro 30 giorni dall'esito istologico della biopsia colposcopica. Tutte le diagnosi istologiche sono state refertate da patologi dedicati alla patologia ginecologica, nella maggior parte dei casi con lettura consensuale e in accordo con il sistema CIN [6].

L'esame istologico dei campioni prelevati dalla cervice uterina ha evidenziato CIN1 in 320 casi (32.5%), CIN2 o CIN3 in 240 (26.4%) e neoplasia della cervice in 25 casi (0.3%); 334 (36.7%) biopsie sono risultate negative per displasia. Nell'analisi dei dati, abbiamo considerato sia i risultati delle biopsie eseguite in colposcopia sia, nel caso le lesioni fossero più gravi, i risultati ottenuti dopo LEEP/cono. La severità del CIN è risultata maggiore in 30 (8.8%) di questi casi; non sono state osservate regressioni spontanee.

Analisi statistica

Abbiamo eseguito le analisi dei dati con il test *one-way* ANOVA e χ^2 -test per confrontare, rispettivamente, le variabili continue e di categoria. Il coefficiente di correlazione di Spearman è stato utilizzato per esaminare la tendenza lungo le categorie ordinate. Un test tipo Wilcoxon è stato usato per testare la tendenza lineare di variabili ordinali, correggendo per eventuali fattori di confusione [7].

Le associazioni tra variabili esplicative ed anomalie cito-istologiche sono state valutate mediante l'uso di modelli logistici multinomiali. Le variabili

esplicative inserite nei modelli di studio sono state: numero di HPV identificati (0, 1, 2, ≥ 3), classe di rischio (negativo, HPV a basso rischio, singolo HPV ad alto rischio, multipli HPV a basso ed alto rischio e multipli HPV ad alto rischio), l'età (variabile continua), precedente trattamento di SIL (si, no), contraccettivo orale (si, no), gravidanze precedenti (si, no) e storia di infezione da HIV (si, no). Il livello statistico di significatività derivante dall'aggiunta o dalla rimozione delle variabili è stato fissato a $P < 0.1$. Modelli di regressione logistica sono stati anche usati per testare l'andamento lineare delle probabilità di ottenere i risultati studiati con l'aumentare dell'esposizione (per esempio numero crescente di infezioni da HPV) aggiustando per fattori confondenti.

La frazione di CIN attribuibile a specifici genotipi virali (frazione attribuibile) è stata calcolata con modelli di regressione logistica per un disegno di studio trasversale includente variabili come l'età, precedenti SIL/CIN, Pap-test, positività ad HIV e uso di contraccettivi orali [8].

Tutte le analisi sono state compiute utilizzando il *software* statistico Stata/MP 10 per Windows (StataCorp LP, College Station, TX).

RISULTATI

Complessivamente, la prevalenza di infezione da HPV era pari al 68.9% (912/1323), 97.3% (311/320) nelle donne con CIN1 e 98.1 (260/265) con CIN ≥ 2 . Le donne HPV-positivo erano più giovani rispetto a quelle HPV-negative (35.9 ± 10.6 anni rispetto a 37.3 ± 10.4 , $P = 0.026$) e sono state trattate più frequentemente per SIL/CIN (25/411 vs 103/912, $P < 0.001$) (tabella 1).

L'infezione da un singolo genotipo di HPV è stata identificata in 327 donne (24.7%) mentre le infezioni multiple da HPV sono state individuate in 585

(44.2%) casi, includendo il 63.1% (202/320) con CIN1 e l'80.8% (214/265) con CIN \geq 2. La prevalenza di infezioni multiple si è rivelata più alta di quanto ci si aspettasse ed era correlata ad una storia precedente di SIL/CIN ($P < 0.001$) e alla positività delle biopsie della cervice uterina ($P < 0.001$) (tabella 1).

L'età media delle donne con infezione da singolo HPV non è risultata statisticamente significativa rispetto a quella delle pazienti infette da più genotipi virali (35.8 ± 11.2 anni rispetto a 36.0 ± 10.8 anni, $P = 0.67$).

Sono stati individuati 23 differenti genotipi virali; la loro prevalenza è riportata in tabella 2. HPV 16, 31 e 52 sono stati i più comuni genotipi che abbiamo riscontrato. Infezioni da HPV-6, 11, 16 o 18 sono associate con il 59.4% (190/320) delle CIN1 e con il 71.3% (189/265) delle CIN \geq 2. Le frazioni attribuibili di ciascun CIN e CIN \geq 2 calcolate per le infezioni da HPV-6, 11, 16 o 18 sono state dello 0.30 (95% intervallo di confidenza (CI), 0.26-0.35) e dello 0.43 (95% CI, 0.33-0.52), rispettivamente. I differenti genotipi di HPV non erano distribuiti in modo differente tra le infezioni singole e multiple.

Abbiamo calcolato gli *Odds Ratios* (OR) dei CIN per i differenti tipi di HPV per infezioni da genotipo singolo in confronto con il campione rimanente dello studio e li abbiamo riportati in tabella 3. A causa del numero esiguo di infezioni singole, abbiamo potuto calcolare gli OR solo per i tipi più rappresentati. Sono state osservate differenze significative tra genotipi di HPV a basso e ad alto rischio. Ciononostante noi non abbiamo osservato un rischio oncogeno massimo associato ad infezioni da HPV-16 come precedentemente riportato [9].

L'associazione tra il numero dei genotipi infettanti di HPV e i risultati citologici ed istologici è stata ulteriormente analizzata (tabella 4). Un andamento lineare altamente significativo tra l'aumentare della severità

delle lesioni cervicali e il numero dei genotipi è stato osservato per entrambi gli esiti citologici (Spearman $R=0.94$, $P=0.001$) ed istologici (Spearman $R=0.67$, $P<0.0001$). Risultati simili sono stati ottenuti quando i dati sono stati stratificati in base alla classe di rischio oncogeno (Spearman $R=0.9$, $P=0.001$ e 0.64 $P<0.0001$ per esiti citologici ed istologici, rispettivamente; tabella 5). L'effetto della classe e del numero dei genotipi di HPV è stato più rilevante per gli esiti istologici rispetto a quelli citologici e per lesioni $CIN \geq 2$ piuttosto che $CIN1$.

Queste analisi sono state ulteriormente analizzate con modelli di regressione logistica multinomiali. Le variabili ottenute hanno considerato sia la diagnosi istologica che quella citologica. Le variabili esplicative incluse inizialmente nel modello erano: numero di genotipi di HPV o classe di rischio oncogeno, età, storia di SIL/CIN, uso di contraccettivi orali, precedenti gravidanze e storia di infezione da HIV. A causa del piccolo numero di casi, dal modello sono stati esclusi i 5 risultati che hanno presentato diagnosi di neoplasia della cervice uterina. I fattori associati indipendentemente con anomalie citologiche o istologiche erano l'età, la storia di SIL/CIN e sia l'aumentato numero di genotipi virali che il rischio oncogeno delle classi (tabelle 6-9).

Complessivamente, i test non-parametrici riguardanti la relazione lineare tra la severità crescente della lesione CIN con il numero di HPV o con la classe di rischio, stratificata in base al quartile dell'età e a precedenti trattamenti, sono risultati statisticamente significativi ($\chi^2=9.94$, $P=0.0016$ e $\chi^2=8.29$, $P=0.004$ rispettivamente). I dati evidenziando una correlazione lineare tra l'aumentare del numero di infezioni da HPV con i differenti strati dei risultati studiati, ottenuti con una regressione logistica, sono riportati nelle tabelle 6-9.

Per valutare l'effetto finale di infezioni multiple su CIN ad alto grado/neoplasia, indipendentemente da biopsie negative, abbiamo ripetuto la regressione logistica multinomiale usando CIN1 come categoria di riferimento. In questo modello, c'era un *trend* lineare significativo che metteva in relazione l'aumento del numero di infezioni da HPV con la prevalenza di CIN ad alto grado/neoplasia (P per *trend* <0.001).

La probabilità di CIN ad alto grado/neoplasia era più che quadrupla tra donne infettate da due o più genotipi di HPV rispetto a quello non infettate (OR=4.72, 95% CI 1.49-14.93, P=0.008). Inoltre l'OR di CIN ad alto grado/neoplasia tra donne con infezioni multiple messe in confronto con quelle con infezioni singole da HPV era 2.54 (95% CI 1.70-3.79, P<0.001).

La forza di associazione tra le infezioni multiple e la severità delle lesioni nella cervice uterina non è cambiata anche escludendo dal modello HPV-16 o le infezioni causate dai 4 genotipi virali dai quali sono stati costituiti i vaccini attualmente disponibili, HPV-6, 11, 16 e 18 (tabella 10-11).

DISCUSSIONE

I risultati del presente studio descrivono la prevalenza e la distribuzione di un importante numero di genotipi di HPV genitali in un campione di 1323 donne Italiane che si sono sottoposte a colposcopia e a biopsia cervicale.

Dai nostri dati si evince che il 35.9 % (210/585) delle lesioni CIN è sostenuto interamente da genotipi di HPV che non sono inclusi nei vaccini multivalenti attualmente disponibili.

I vaccini disponibili inducono un'immunità predominante tipo-specifica [8], perciò, con il presupposto che la distribuzione osservata dei genotipi virali è rappresentativa della popolazione generale, la frazione attribuibile attesa sia

di CIN di basso grado, che di CIN di alto grado, sarebbe del 30% e del 43% rispettivamente. Inoltre, l'80.7% (214/265) delle lesioni istologiche di alto grado/invasive sono associate con infezioni da genotipi multipli di HPV.

Infine, il numero di tipi virali correla significativamente con il rischio di sviluppare una lesione displastica, indipendentemente dall'infezione dei principali tipi oncogeni, HPV-16 e HPV-18 [9].

Il nostro studio amplia significativamente i precedenti studi pubblicati tenendo in considerazione un numero significativamente più ristretto di soggetti e di diagnosi confermate istologicamente. Inoltre, esso riporta nuovi dati che possono aiutare a chiarire l'epidemiologia delle infezioni multiple da HPV ed il loro impatto sul rischio di lesioni cervicali precancerose, contribuendo al dibattito attuale sull'impatto potenziale dei vaccini contro l'HPV. Prima di considerare in dettaglio i risultati specifici, alcune questioni metodologiche dovrebbero essere messe a punto. I principali punti di forza dello studio possono essere riassunti come segue:

1. Questo è uno studio condotto in un'unica unità operativa in un breve periodo di osservazione.
2. L'analisi si basa su un campione consistente di donne che si sono sottoposte sistematicamente all'esame colposcopio.
3. La popolazione oggetto di studio comprende un panorama etnico omogeneo.
4. La correlazione è avvenuta con dati confermati istologicamente mediante biopsia incisionale nel 69% dei casi e mediante cono biopsia/LEEP nel 25%.

5. Lo studio delle infezioni da HPV é stato condotto con l'uso di metodi di genotipizzazione aggiornati che hanno permesso l'identificazione sensibile e simultanea di 25 differenti tipi virali.
6. L'analisi statistica é stata effettuata con il modello multivariato.

Mentre, si potrebbe obiettare ai dati prodotti, considerando alcune limitazioni di questo studio:

1. L'analisi é stata condotta su un gruppo selezionato di pazienti, non rappresentativo della popolazione generale della nostra area.
2. Il disegno di studio é stato trasversale.
3. Non si é tenuto conto di fattori confondenti socio-economici e comportamentali, come il livello di studio, l'età del primo rapporto e la recente attività sessuale [10].

Argomentando le limitazioni di questo studio, si potrebbe per prima cosa affermare che nessun disegno di studio specifico é intrinsecamente superiore ad un altro. In effetti, Autori precedenti avevano considerato sia la popolazione generale, sia gli esiti citologici anomali in accordo con l'analisi trasversale o gli studi prospettici.

In primo luogo, l'analisi trasversale focalizzata su donne con citologia anomala é efficace, in quanto fornisce un ampio campione rappresentativo dell'intero spettro di lesioni cervicali epiteliali ed é particolarmente adatta per lo studio delle correlazioni patologiche. L'arruolamento di un numero paragonabile di casi di probabile SIL da una coorte non selezionata avrebbe dovuto richiedere un enorme sforzo. Secondariamente, l'analisi trasversale non distingue le infezioni transitorie, da quelle persistenti e le infezioni incidenti, da quelle prevalenti. Se la durata dell'infezione da HPV é determinante nelle strategie di *screening* o trattamento, é meno rilevante nella gestione della colposcopia.

La scoperta che il tipo ed il numero di HPV correla fortemente con le lesioni di alto grado ha avuto implicazioni rilevanti per la gestione immediata di una donna con citologia anomala.

Infine, la stima delle correlazioni epidemiologiche dell'infezione da HPV non é l'obiettivo primario dello studio. Queste sono ben conosciute da precedenti indagini, sono condivise da tutti gli Autori, indipendentemente dal tipo e numero di HPV, e non sono fattori di rischio per la severità di lesioni displastiche [10-11]. Perciò, l'esclusione di variabili comportamentali dall'analisi non dovrebbe influenzare l'interpretazione complessiva dei dati.

La distribuzione osservata dei tipi di HPV é essenzialmente identica a quella riportata da altri Autori del Nord e Sud Italia, sia nella popolazione generale che in donne con citologia anomala. Variazioni minori regionali sono state viste come recentemente discusso da Capra e collaboratori nel 2008. Viceversa, le maggiori differenze si sono osservate nella frequenza di coinfezioni da HPV messe a confronto con studi italiani precedenti che riportano le prevalenze in un intervallo dal 2% al 49.7%.

Nella nostra popolazione, il 64.1% (585/812) delle donne HPV-positivo sono infette da almeno due differenti tipi e il 20.3% (185/912) da tre o più. Solamente gli Autori che hanno impiegato i metodi di tipizzazione LiPA o *Linear Array* (LA), che assicurano la più alta efficacia nella scoperta e rilevazione dei tipi virali [12], hanno ottenuto dati paragonabili.

I dati di Gargiulo rimangono i più rilevanti tra quelli riportati in Italia, anche considerando la metodologia e la popolazione bersaglio, ma sono completamente paragonabili con quelli riportati dagli studi internazionali recenti e metodologicamente sopraccitati [13].

Possibili spiegazioni a questa discrepanza sono il grande numero di casi

di lesioni di alto grado istologicamente confermate provenienti dai nostri dati e la specificità della citologia di riferimento come dimostrato dal tasso esiguo di ASC/SIL al Pap-test.

Il ruolo delle infezioni multiple sul rischio di lesioni cervicali epiteliali è stimato separatamente per le diagnosi citologiche e istologiche, e considerando sia il numero dei genotipi virali che le classi oncogene di HPV. I dati sono stati anche controllati valutando le maggiori variabili di confondimento che includono l'età, una storia precedente di SIL/CIN, il grado delle lesioni e lo stato di sieropositività per HIV.

L'effetto del numero di genotipi di HPV sul rischio di CIN di alto grado è fortemente significativo anche dopo l'esclusione delle biopsie negative e considerando il CIN1 come categoria di riferimento. Entrambe le comparazioni mostrano che il rischio aumenta in modo direttamente proporzionale con il numero di genotipi infettanti senza tener conto della classe oncogena. Un rischio aumentato si è osservato non solo per infezioni sostenute da tipi ad alto rischio, ma anche per l'associazione tra genotipi a basso e alto rischio. Risultati simili si sono ottenuti considerando classi filogenetiche al posto di genotipi virali o classi oncogene in accordo con altri Autori. Queste osservazioni supportano la nozione che qualsiasi virus infettivo aggiuntivo contribuisce al rischio di CIN e che il singolo genotipo di HPV non esercita un effetto oncogeno massimale.

Nei nostri dati, gli OR per CIN calcolati per i più comuni genotipi oncogeni, HPV-16 e HPV-18, non sono più alti di quelli di altri genotipi ad alto rischio. Inoltre le associazioni tra il numero e la classe dei genotipi virali e il rischio di CIN sono mantenute dopo aver controllato la presenza di HPV-16 e altri genotipi di HPV bersagli del

vaccino. Infatti, l'errata classificazione o la sottovalutazione di infezioni multiple possono avere implicazioni rilevanti sulla stima della cancerogenicità tipo-specifica.

Gli OR sono più alti per le diagnosi istologiche di CIN che per le diagnosi citologiche di SIL e per le lesioni di alto grado rispetto a quelle di basso grado. Considerando che l'istologia consente una più alta accuratezza diagnostica (25% dei nostri L-SIL erano di grado superiore dopo biopsia o conizzazione) e che la maggior parte delle lesioni L-SIL sono sostenute da infezioni da HPV transitorie, entrambe le considerazioni aggiungono forza ai risultati e suggeriscono un vero effetto biologico.

Correlazioni simili tra infezioni multiple da HPV e SIL sono state riportate precedentemente e un singolo studio ha anche trovato un'associazione tra infezioni multiple e progressione di neoplasia. Specialmente Trottier e colleghi [2] hanno ottenuto risultati completamente paragonabili e hanno calcolato OR di grandezza simile sia per infezioni singole che multiple. Loro hanno anche scoperto che l'effetto del numero di genotipi di HPV non era intaccato dalla presenza di HPV-16. Altri Autori hanno fallito nel mostrare un effetto di infezioni multiple sul rischio di SIL una volta spiegato dalla classe oncogena. Alcuni di questi studi precedenti erano però limitati da un esiguo numero di soggetti con H-SIL, avevano preso in considerazione per lo più i risultati citologici e non avevano aggiustato i dati eliminando i fattori confondenti.

Altri studi, come quelli derivati da un *follow-up* prospettico della coorte ALTS, includenti solo donne con piccoli cambiamenti citologici che sono risultati negativi per H-SIL, sono stati sottoposti ad uno *screening* ad alta intensità e sono stati seguiti per brevi periodi. È stato dimostrato che in

questo scenario il comportamento delle infezioni prevalenti ed incidenti é molto simile, perciò, la maggior parte delle donne verosimilmente ospitano nuove infezioni con un'alta probabilità di risoluzione spontanea.

In disaccordo con questi ultimi studi, la maggior parte dei nostri casi si ritiene rappresenti infezioni persistenti basate sull'età delle donne, le correlazioni istologiche e l'associazione tra il numero di HPV e precedente SIL. Infatti, la persistenza di HPV si é dimostrata aumentare sia il rischio di coinfezione che di avere H-SIL.

Studi su nuove infezioni incidenti sono utili per mettere a punto le dinamiche di persistenza e regressione di specifici genotipi virali, ma possono esporre ad errata classificazione di esposizione e includono quei soggetti più suscettibili a persistenza di HPV e corrispondentemente a SIL.

Brevi studi di *follow-up* possono fallire nell'apprezzare pienamente la potenza di soggetti persistentemente coinfezati a causa della possibilità di trovare genotipi multipli di HPV che aumenta con il periodo di osservazione. È rilevante a questo proposito che Trottier e colleghi [2], che hanno raggiunto le nostre stesse conclusioni usando dati di uno studio prospettico di SIL incidenti, abbiano basato i loro calcoli su tassi cumulativi di coinfezioni in un periodo di 4 anni. Loro hanno anche osservato che l'associazione di coinfezioni era più forte per H-SIL rispetto a L-SIL e dopo aver escluso le infezioni transitorie.

I possibili meccanismi mediante i quali infezioni multiple potrebbero aumentare il rischio di lesioni cervicali intraepiteliali sono oggetto di dibattito. Essi potrebbero essere messi in relazione con fattori comportamentali o virali, come la cotrasmissione o le infezioni facilitate; due argomenti che non supportano il ruolo dei fattori epidemiologici o delle

interazioni virali sono da una parte, che le donne con infezioni singole o multiple condividono fattori di rischio epidemiologici simili, dall'altra che genotipi di HPV diversi sono stati acquisiti indipendentemente almeno nelle infezioni incidenti. Meccanismi alternativi potrebbero dipendere dalla persistenza virale differente o dall'aumentata suscettibilità dell'ospite. I genotipi di HPV differiscono nei tassi di persistenza e la coinfezione aumenta la durata sia delle infezioni prevalenti che incidenti, perciò, una capacità diversa di persistere potrebbe favorire il sommarsi di alcuni genotipi virali nel tempo.

Un corollario a questa ipotesi potrebbe essere il *clustering* di specifici genotipi virali in accordo con la severità delle lesioni e/o l'età della paziente. Per chiarire questo punto, noi abbiamo pensato ad uno studio parallelo per studiare specificatamente l'equilibrio e i *pattern* di associazione dei tipi/classi di HPV, una questione che è stata così vagamente citata con risultati non consistenti. Una persistenza differente non esclude una suscettibilità dell'ospite aumentata: un'ipotesi di lavoro che noi abbiamo sostenuto per spiegare l'effetto delle infezioni multiple da HPV. Un'evidenza indiretta del ruolo di fattori individuali deriva dall'apprezzamento di una piccola porzione di individui esposti che ultimamente sviluppano lesioni cervicali progressive e per la forte correlazione esistente tra infezioni multiple, età giovane ed immunodepressione. Alcune donne potrebbero essere più permissive verso l'HPV e permettere alle infezioni indipendenti di raggiungere titoli virali distinguibili e mostrare un effetto oncogeno.

Alternativamente, infezioni multiple potrebbero rappresentare semplicemente un mandato di efficacia immunitaria privo di qualsiasi

effetto causale o implicazione biologica sull'espressione della malattia. La valutazione dei titoli virali in accordo con il numero e la classe delle infezioni da HPV potrebbe fornire importanti risultati a questo riguardo.

Indipendentemente dai meccanismi sottostanti, nella gestione colposcopica, le infezioni multiple da HPV, specialmente se sostenute da genotipi ad alto rischio, identificano un sottoinsieme di donne ad aumentato rischio per CIN di alto grado e carcinoma, che dovrebbe ricevere una particolare attenzione. Alcune considerazioni di questi risultati dovrebbero diventare imperativi nella nostra pratica clinica, senza tuttavia poter essere generalizzati al momento attuale perché, in primo luogo, altre popolazioni con differenti caratteristiche potrebbero mostrare altre distribuzioni di genotipi di HPV e in secondo luogo, anche se noi usassimo un metodo di tipizzazione largamente validato, variazioni nell'efficacia dell'identificazione e di genotipi specifici potrebbero essere riportate tra i metodi di tipizzazione, specialmente nelle infezioni multiple.

Infine, a limitare il nostro studio i risultati della tipizzazione non sono stati ottenuti da lesioni tissutali, ma da cellule esfoliate e il rischio di progressione di CIN sostenuta da infezioni multiple, specialmente quelle interessanti genotipi non inclusi nei vaccini, deve ancora essere stabilito.

In conclusione, la frequenza di infezioni multiple da HPV, la sua distribuzione e il rischio associato di CIN mettono in luce l'importanza dell'individuazione dei singoli genotipi virali nella condotta clinica e la predizione del risultato nelle donne con citologia di base anomala e segnalano le potenziali limitazioni nelle strategie vaccinali correnti.

	Negativa (n=411)	Singola (n=327)	Multipla (N=585)	P
Età				
<i>≤20 anni</i>	12	20	27	0.24
<i>20-49 anni</i>	362	269	513	
<i>≥50 anni</i>	37	38	45	
Precedenti gravidanze				
<i>No</i>	189	163	310	0.12
<i>I</i>	103	65	111	
<i>>I</i>	119	99	164	
Uso di contraccettivi orali				
<i>No</i>	259	213	381	0.55
<i>Si</i>	152	114	204	
Infezione da HIV				
<i>No</i>	400	316	568	0.31
<i>Si</i>	11	11	17	
Precedente trattamento CIN				
<i>No</i>	386	303	506	<0.001
<i>Si</i>	25	24	79	
Biopsia della cervice				
<i>No</i>	166	116	122	<0.001
<i>Si</i>	245	211	463	
Risultati del Pap-test				
<i>Negativo</i>	132	61	86	<0.001
<i>Low Sil</i>	169	196	336	
<i>High Sil</i>	8	19	82	
<i>Ascus/Agus</i>	102	51	81	

Tabella 1. Caratteristiche demografiche delle 1323 donne arruolate in accordo con lo stato dell'infezione da HPV (χ^2 test).

Genotipi HPV	Tutte le donne infette (n=912)		Donne con infezione multipla (n=585)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
6	162	(17.8)	123	(21.0)
11	106	(11.6)	87	(14.9)
16	385	(42.2)	305	(52.1)
18	115	(12.6)	109	(18.6)
31	245	(26.9)	197	(33.7)
45	48	(5.3)	37	(6.3)
51	163	(17.9)	135	(23.1)
52	171	(18.7)	142	(24.3)
53	61	(6.7)	39	(6.7)
56	49	(5.4)	39	(6.7)
58	34	(3.7)	29	(5.0)
42	12	(1.3)	6	(1.0)
33	35	(3.8)	33	(5.6)
35	18	(2.0)	15	(2.6)
39	26	(2.9)	18	(3.1)
40	33	(3.7)	31	(5.3)
59	6	(0.7)	5	(0.9)
43	4	(0.4)	4	(0.7)
44	13	(1.4)	12	(2.1)
66	21	(2.3)	19	(3.2)
68	14	(1.5)	11	(1.9)
70	3	(0.3)	2	(0.3)
74	1	(0.1)	1	(0.2)

Tabella 2. Frequenza dei genotipi di HPV e OR corrispondenti (95% CI) per risultati istologici CIN tra donne con infezione da singoli genotipi di HPV.

Genotipi HPV	CIN1		CIN \geq 2	
	<i>n</i>	OR (95% CI)	<i>n</i>	OR (95% CI)
6	5	0.80 (0.28-2.28)	0	Indefinito
11	2	0.81 (0.16-4.06)	1	0.94 (0.11-7.95)
16	35	8.89 (4.49-17.58)	10	5.14 (2.12-12.48)
18	2	Indefinito	3	Indefinito
31	23	17.13 (5.78-50.79)	14	26.77 (8.37-85.64)
45	5	12.65 (1.46-109.52)	3	17.85 (1.82-175.41)
51	8	4.10 (1.31-12.81)	4	4.80 (1.24-18.52)
52	11	7.27 (2.27-23.34)	5	7.69 (1.99-29.70)
53	3	3.72 (0.61-22.54)	1	2.85 (0.25-32.02)

Tabella 3. L'OR di CIN per ciascun genotipo di HPV è stato comparato con i soggetti rimanenti. Non è stato possibile calcolare l'OR per gli altri genotipi di HPV a causa del numero esiguo o nullo delle infezioni singole

	NUMERO DI GENOTIPI VIRALI DI HPV									
	0		1		2		3		>3	
Citologia (P=0.001 R=0.94)	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Negativo	132	32	61	19	61	15	22	14	3	10
Low Sil	169	41	196	60	238	59.5	80	52	18	56
High Sil	8	1.8	19	6	42	10	31	19	9	28
Ascus/Agus	102	25	51	15	59	15	20	13	2	6
Istologia (P<0.001 R=0.67)	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Negativo	231	94	56	26.5	40	13.5	7	5	0	0
CIN1	9	4	109	51.5	160	53	39	30	3	10
CIN \geq 2	1	0.5	41	19.5	95	31.5	75	57	28	90
Carcinoma	4	1.5	5	2.5	6	2	10	8	0	0

Tabella 4. Associazione tra risultati citologici ed istologici e numero di genotipi virali di HPV identificati.

	CLASSE DI RISCHIO									
	Negativo		Low risk		Single high risk		Low/high risk		Multiple high risk	
Citologia (P=0.001 R=0.9)	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>Negativo</i>	132	32	21	22	44	17	31	16.5	51	14
<i>Low Sil</i>	169	41	55	58	158	61	109	57	210	57
<i>High Sil</i>	8	1.8	1	1	18	7	20	10	58	16
<i>Ascus/Agus</i>	102	25	18	19	39	15	31	16.5	44	12
Istologia (P<0.001 R=0.64)	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>Negativo</i>	231	94	24	46	35	20	16	10.4	28	9.4
<i>CINI</i>	9	4	24	46	98	55	70	47.6	119	40
<i>CIN ≥2</i>	1	0.5	3	6	40	22.6	57	39	139	46.6
<i>Carcinoma</i>	4	1.5	1	2	4	2.4	4	3	12	4

Tabella 5. Associazione tra risultati citologici ed istologici e tipo di infezione (classe di rischio oncogeno virale).

	Variabile	OR	95 CI	Trend
<i>Negativo</i>		Reference		
<i>L-SIL</i>	<i>0 HPV</i>	Reference		<0.001
	<i>1 HPV</i>	2.6	1.80-3.80	
	<i>2 HPV</i>	3.61	2.49-5.31	
	<i>≥3 HPV</i>	3.63	2.15-5.95	
	<i>Età</i>	0.99	0.98-1	
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.25	0.16-0.39	
<i>H-SIL</i>	<i>0 HPV</i>	Reference		<0.001
	<i>1 HPV</i>	5.45	2.25-13.2	
	<i>2 HPV</i>	14.1	6.17-32.13	
	<i>≥3 HPV</i>	31.38	12.97-75.91	
	<i>Età</i>	1.025	1.0-1.048	
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.27	0.13-0.55	
<i>ASC/AGC</i>	<i>0 HPV</i>	Reference		0.02
	<i>1 HPV</i>	1.08	0.68-1.72	
	<i>2 HPV</i>	1.30	0.83-2.05	
	<i>≥3 HPV</i>	1.17	0.62-2.22	
	<i>Età</i>	1.54	1.03-1.07	
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.17	0.09-0.34	

Tabella 6. OR e intervalli di confidenza al 95 di risultati citologici patologici in relazione al numero di genotipi virali di HPV, all'età e a precedenti SIL/CIN.

	Variabile	OR	95 CI	Trend
Negativo		Reference		
CIN1	<i>0 HPV</i>	Reference		<0.001
	<i>1 HPV</i>	50.78	24.0-107.49	
	<i>2 HPV</i>	107.66	50.13-231.22	
	<i>≥3 HPV</i>	177.02	61.48-510.05	
	<i>Età</i>	0.95	0.94-0.97	
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.43	0.19-0.94	
CIN ≥2/ carcinoma	<i>0 HPV</i>	Reference		<0.001
	<i>1 HPV</i>	38.4	1.5-101.4	
	<i>2 HPV</i>	121.4	46.3-318.4	
	<i>≥3 HPV</i>	817	251-2655	
	<i>Età</i>	0.97	0.95-0.99	
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.46	0.2-1.07	

Tabella 7. OR e intervalli di confidenza al 95 di risultati istologici patologici in relazione al numero di genotipi virali di HPV, all'età e a precedenti SIL/CIN.

	Variabile	OR	95 CI	Trend
<i>Negativo</i>		Reference		
<i>L-SIL</i>	<i>Negativo</i>	Reference		<0.001
	<i>Low risk</i>	1.89	1.08-3.29	
	<i>Single high risk</i>	3.07	2.02-4.64	
	<i>Low/high risk</i>	3.13	1.95-5.02	
	<i>Multiple high risk</i>	4.03	2.69-6.04	
	<i>Età</i>	0.99	0.98-1	
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.24	0.15-0.37	
<i>H-SIL</i>	<i>Negativo</i>	Reference		<0.001
	<i>Low risk</i>	0.66	0.08-5.61	
	<i>Single high risk</i>	7.79	3.14-19.30	
	<i>Low/high risk</i>	12.43	4.96-31.16	
	<i>Multiple high risk</i>	26.91	11.85-61.15	
	<i>Età</i>	1.02	1.00-1.05	
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.22	0.11-0.46	
<i>ASC/AGC</i>	<i>Negativo</i>	Reference		0.1
	<i>Low risk</i>	0.88	0.44-1.77	
	<i>Single high risk</i>	1.35	0.80-2.28	
	<i>Low/high risk</i>	1.52	0.84-2.72	
	<i>Multiple high risk</i>	1.58	0.95-2.63	
	<i>Età</i>	1.05	1.03-1.07	
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.17	0.08-0.33	

Tabella 8. OR e intervalli di confidenza al 95 di risultati citologici patologici in relazione alla classe di rischio oncogeno virale, all'età e a precedenti SIL/CIN.

	Variabile	OR	95 CI	Trend
Negativo		Reference		
CIN1	<i>Negativo</i>	Reference		<0.001
	<i>Low risk</i>	26.5	10.84-64.69	
	<i>Single high risk</i>	72.45	33.21-158.20	
	<i>Low/high risk</i>	121.31	50.62-290.93	
	<i>Multiple high risk</i>	177.49	52.77-261.59	
	<i>Età</i>	0.95	0.93-0.97	
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.38	0.17-0.84	
CIN \geq2/ carcinoma	<i>Negativo</i>	Reference		<0.001
	<i>Low risk</i>	7.7	1.90-30.6	
	<i>Single high risk</i>	59.2	21.9-159.9	
	<i>Low/high risk</i>	185.4	65-528.5	
	<i>Multiple high risk</i>	270.3	101.2-722	
	<i>Età</i>	0.96	0.94-0.98	
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.4	0.17-0.88	

Tabella 9. OR e intervalli di confidenza al 95 di risultati istologici patologici in relazione alla classe di rischio oncogeno virale, all'età e a precedenti SIL/CIN.

	Variabili	TUTTE LE DONNE	P
CITOLOGIA			
<i>Negativo</i>		Reference	
L-SIL	<i>Infezione singola</i>	Reference	<0.005
	<i>Infezioni multiple</i>	2.39 (1.76-3.25)	
	<i>Età</i>	1.00 (0.98-1.01)	
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.27 (0.17-0.41)	<0.005
H-SIL	<i>Infezione singola</i>	Reference	<0.005
	<i>Infezioni multiple</i>	8.08 (4.83-13.54)	
	<i>Età</i>	1.03 (1.01-1.05)	<0.005
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.27 (0.13-0.56)	<0.005
ASC/AGC	<i>Infezione singola</i>	Reference	<0.05
	<i>Infezioni multiple</i>	1.47(1.00-2.18)	
	<i>Età</i>	1.06 (1.04-1.08)	<0.005
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.17 (0.09-0.35)	<0.005
ISTOLOGIA			
<i>Negativo</i>		Reference	
CINI	<i>Infezione singola</i>	Reference	<0.005
	<i>Infezioni multiple</i>	11.05 (7.5-17.5)	
	<i>Età</i>	0.95 (0.94-0.97)	<0.005
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.34 (0.15-0.77)	<0.005
CIN ≥2/ carcinoma	<i>Infezione singola</i>	Reference	<0.005
	<i>Infezioni multiple</i>	27.6 (17.2-44.2)	
	<i>Età</i>	0.97(0.95-0.99)	<0.05
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.36(0.15-0,82)	<0.05

Tabella 10. Odds Ratios ed intervalli di confidenza al 95 di risultati citologici ed istologici in relazione ad infezioni singole *versus* multiple da HPV, all'età e a precedenti SIL/CIN (sono escluse le donne con infezione da HPV-16 ed infezione multipla da HPV-6, 11, 16, 18).

	Variabili	HPV-16	HPV-6, 11, 16, 18
CITOLOGIA			
Negativo		Reference	
L-SIL	<i>Infezione singola</i>	Reference	
	<i>Infezioni multiple</i>	2.40* (1.61-3.58)	2.75* (1.59-4.74)
	<i>Età</i>	1.00 (0.98-1.01)	1.01 (0.99-1.03)
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.42* (0.24-0.76)	0.54 (0.28-1.06)
H-SIL	<i>Infezione singola</i>	Reference	
	<i>Infezioni multiple</i>	6.26* (3.12-12.51)	7.47* (3.14-17.78)
	<i>Età</i>	1.04**(1.01-1.07)	1.04**(1.01-1.08)
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	1.06 (0.41-2.75)	1.52 (0.49-4.66)
ASC/AGC	<i>Infezione singola</i>	Reference	
	<i>Infezioni multiple</i>	1.56 (0.95-2.57)	1.36 (0.67-2.75)
	<i>Età</i>	1.06* (1.04-1.08)	1.07* (1.05-1.09)
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.18* (0.06-0.49)	0.26**(0.09-0.76)
ISTOLOGIA			
Negativo		Reference	
CINI	<i>Infezione singola</i>	Reference	
	<i>Infezioni multiple</i>	16.15* (9.6-27.0)	14.40* (7.4-27.9)
	<i>Età</i>	0.96* (0.94-0.97)	0.96* (0.93-0.98)
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	0.62 (0.22-1.79)	1.01 (0.35-2.90)
CIN ≥2/ carcinoma	<i>Infezione singola</i>	Reference	
	<i>Infezioni multiple</i>	19.28* (10.9-34.1)	21.53* (10.5-43.9)
	<i>Età</i>	0.99 (0.97-1.01)	1.00 (0.98-1.03)
	<i>Precedenti SIL/CIN</i>	1.79 (0.67-4.76)	1.36 (0.43-4.27)

Tabella 11. Odds Ratios ed intervalli di confidenza al 95 di risultati citologici ed istologici in relazione ad infezioni singole *versus* multiple da HPV, all'età e a precedenti SIL/CIN nelle donne con infezione da HPV-16 ed infezione multipla da HPV-6, 11, 16, 18 (Abbreviazioni: *=P<0.005; **=P<0.05).

RIASSUNTO

Una larga parte delle infezioni da *Human Papillomavirus* (HPV) é sostenuta da genotipi multipli. L'effetto di infezioni multiple sul rischio di neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN) e l'efficacia potenziale del vaccino su queste infezioni sono controversi. Noi abbiamo effettuato una tipizzazione virale con SFP10-LIPA su un campione di 1323 donne che si sono sottoposte a colposcopia, 69 delle quali aveva ricevuto una biopsia cervicale, e abbiamo correlato la severità della CIN con il tipo ed il numero di HPV.

Complessivamente la prevalenza di HPV-DNA era 68.9, 97.3 CIN1 e 98.1 CIN ≥ 2 . La positività all'HPV é stata correlata con l'età più giovane (35.9 vs 37.3 anni, $P=0.026$) e con la storia di CIN ($P<0.001$). Sono stati scoperti genotipi multipli nel 44.2 dei casi, includendo il 63.1 CIN1 e l'80.8 CIN ≥ 2 . Ventitre differenti genotipi si sono rivelati essere i più frequenti: HPV-16, 31 e 52. Infezioni da HPV-6, 11, 16 o 18 sono ricorse nel 59.4 delle CIN1 e nel 71.3 delle CIN ≥ 2 .

Il numero dei genotipi virali e la classe di rischio oncogeno sono risultati essere correlati in modo direttamente proporzionale con la severità della CIN ($P<0.0001$) secondo analisi univariate e multivariate che tenevano in considerazione l'età e la storia di CIN.

L'effetto del numero dei genotipi di HPV ha continuato a persistere dopo l'esclusione dal modello di infezioni da HPV-6, 11, 16 e 18. La frequenza, la distribuzione e i termini di correlazione clinici delle infezioni da multipli genotipi hanno messo in risalto l'importanza di accertare i singoli genotipi nella gestione e nella predizione dell'esito in pazienti con citologia di base anomala e hanno evidenziato le limitazioni potenziali nelle strategie vaccinali attuali

SUMMARY

A large proportion of Human Papillomavirus (HPV) infections is sustained by multiple genotypes. The effect of multiple infections on the risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and the potential efficacy of vaccine on these infections are controversial. We performed viral typing by SFP₁₀-LIPA on a consecutive series of 1323 women undergoing colposcopy, 69 of whom had cervical biopsy, and correlated CIN severity with the type and number of HPVs. Overall prevalence of HPV-DNA was 68.9, 97.3 in CIN1, and 98.1 in CIN ≥ 2 . HPV positivity correlated with younger age (35.9 vs 37.3 years, $P=0.026$) and history of CIN and history of CIN ($P<0.001$). Multiple types were detected in 44.2 of cases, including 63.1 CIN1 and 80.8 CIN ≥ 2 . Twenty-three different types were detected, HPV-16, 31 and 52 being the most frequent. Infections by HPV-6, 11, 16, or 18 occurred in 59.4 of CIN1 and 71.3 of CIN ≥ 2 . Number of viral types and class of oncogenic risk were linearly correlated with CIN severity ($P<0.0001$) by univariate and multivariate analyses controlling for age and history of CIN. The effect of the number of HPV types was maintained after exclusion from the model of infections by HPV-6, 11, 16, and 18. Frequency, distribution, and clinical correlates of multiple HPV infections highlight the importance of assessing individual types in the management and the prediction of outcome of women with abnormal baseline cytology and point to potential limitations in current vaccine strategies.

BIBLIOGRAFIA

1. IARC. Human papillomaviruses. Lyon, France, 2005
2. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 2006;24:S1-S15
3. Roden R, Wu TC. How will HPV vaccines affect cervical cancer?. *Nat Rev Cancer* 2006;6:753-763
4. Kleter B, van Doorn LJ, Scauwen 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;37:2508-2517
5. Bosch X, Harper D. Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynecol Oncol* 2006;103:21-24
6. Solomon D, Davey D, Kurman R et al. 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. *J Am Med Assoc* 2001;287:2114-2119
7. Cuzick J, Szarewski A, Terry G et al. Human papilloma virus testing in primary cervical screening. *Lancet* 1995;345:1533
8. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM et al. A controller trial of a human papilloma virus type 16 vaccine. *N England J Med* 2002;347:1645-1651
9. Castle PE, Solomon D, Schiffman M et al. Human papilloma virus type 16 infections and 2-years absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(14):1066-1071
10. Rousseau MC, Abrahamowicz M, Villa LL et al. Predictors of cervical coinfection with multiple human papilloma virus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1029-1037
11. Mendez F, Munoz N, Posso H et al. Cervical coinfection with human papilloma virus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis* 2005;192:1158-1165
12. van Hamont D, van Ham MA, Bakkers JM et al. Evaluation of the SFP10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol* 2006;44:3122-3129
13. Herrero R, Castle PE, Schiffman M et al. Epidemiologic profile of type specific human papilloma virus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005;191:1796-1807