

Epidemiologia dell'infezione genitale da HPV e delle sue complicazioni, e utilizzo della ricerca molecolare del virus per lo screening del cancro del collo dell'utero

Epidemiology of HPV genital infection and of its complications and use of HPV testing for cervical cancer screening

Guglielmo Ronco

Unità di epidemiologia dei tumori, CPO Piemonte

Corrispondenza: e-mail: guglielmo.ronco@cpo.it

Sommario

In uno studio di grandi dimensioni su donne italiane afferenti a programmi di screening organizzato, la prevalenza d'infezione genitale da tipi di HPV a rischio medio alto è stata del 9%, con una riduzione quasi lineare dal 16% per la fascia di età 25-29 al 4,5% per la fascia 55-60 anni.

Dati d'incidenza a livello di popolazione sono in corso di produzione. Nelle donne di età 25-34 anni circa, il 60% delle infezioni è regredito nel corso di un anno. La maggior parte delle portatrici d'infezione non mostra alterazioni citologiche e le alterazioni di basso grado e *borderline* compaiono a intervallo breve, così come le lesioni intraepiteliali di basso grado confermate istologicamente, che in gran parte regrediscono. La comparsa di lesioni intraepiteliali di alto grado è relativamente rara (la *detection rate* delle stesse nei programmi organizzati italiani di screening, che hanno intervallo triennale, è intorno a 0,3%) e legata alla persistenza dell'infezione. I tipi oncogeni e in particolare il 16 sono i più comuni a livello di popolazione. La frequenza di HPV 16 tra le infettate (1/3 in uno studio) è risultata particolarmente alta rispetto ad altre indagini europee e di altri continenti. I tipi 16 e 18 mostrano una maggior frequenza di progressione verso lesioni di alto grado e tumore invasivo.

Diversi studi hanno dimostrato una maggior sensibilità del test HPV rispetto alla citologia nell'identificare lesioni di alto grado. In Italia si è avviato uno studio randomizzato di grandi dimensioni. Si è conclusa la fase di reclutamento, che ha confermato la maggior sensibilità del test HPV e mostrato che l'aggiunta della citologia in tutte le donne aumenta la sensibilità solo marginalmente, ma diminuisce il valore predittivo positivo (VPP).

L'utilizzo del test HPV come primo test e della citologia per la *triage* delle positive ha permesso di ottenere, rispetto alla citologia convenzionale, dei vantaggi di sensibilità senza perdite di VPP, anche nelle donne più giovani (25-34 anni). I dati sul re-screening delle donne reclutate a 3 anni di distanza, che è in corso, permetteranno di valutare la possibilità di applicare intervalli prolungati e la persistenza delle lesioni individuate dal solo test HPV.

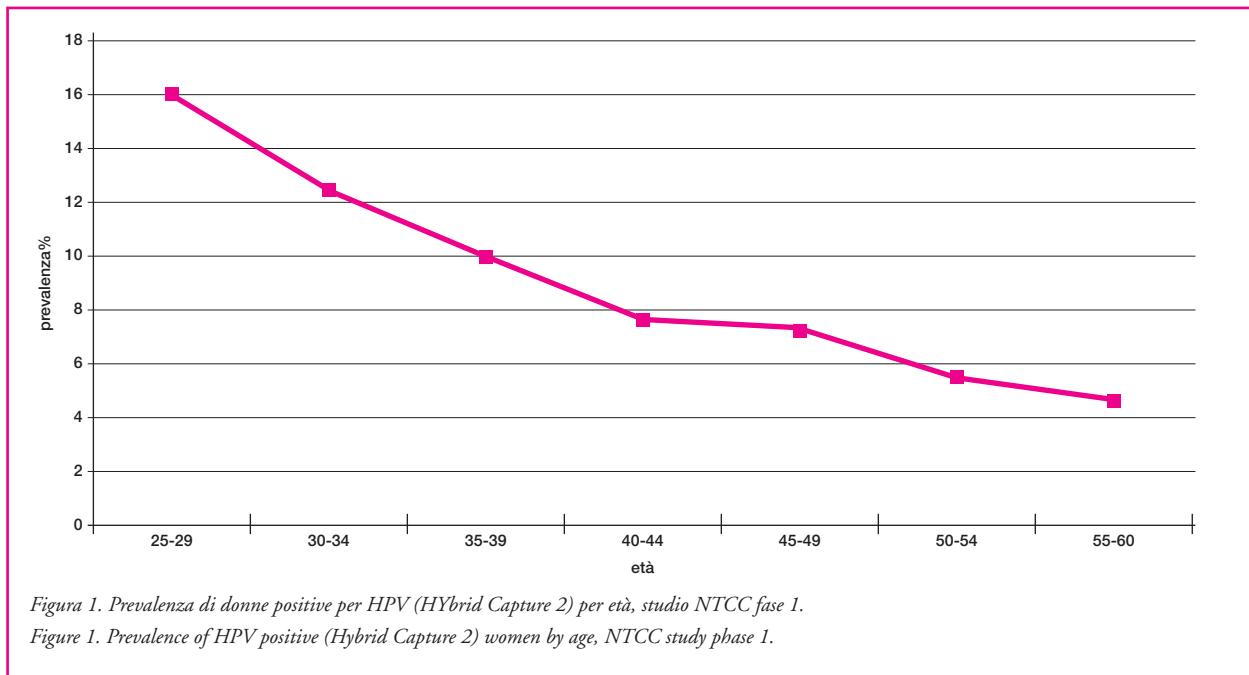
Epidemiologia dell'infezione da HPV e delle sue complicazioni con particolare riferimento all'Italia

Gli studi d'occorrenza dell'infezione genitale da HPV in Italia riguardano sostanzialmente la prevalenza. Studi che hanno coinvolto donne che si erano rivolte a servizi clinici, spesso per sintomi, non possono essere considerati rappresentativi della popolazione. Alcuni studi riguardano donne che si presentano a servizi di screening spontaneo od organizzato, quindi in linea di principio asintomatiche. In particolare i programmi organizzati invitano attivamente l'intera popolazione residente e, benché la rispondenza all'invito sia dell'ordine del 40%, in alcuni programmi si è verificato che la popolazione aderente all'invito (ma non quella che svolge screening spontaneo) non era selezionata per una serie di variabili, quali livello di istruzione, stato civile e luogo di nascita.¹

In uno studio condotto su circa 500 donne di età media di 51 anni presentatesi spontaneamente «per il pap test annuale di routine» a Genova e testate con PCR (*primers* MY09 e MY11) il 15,9% erano positive per l'infezione (ogni tipo).² In un gruppo di 1500 donne di età 18-63 anni presentatesi agli ospedali civili di Brescia per «assistenza ginecologica di routine» e testate sempre con PCR (*primers* MY09 e MY11) il 6,6% presentava DNA virale.³ Tra 235 donne (età mediana 32 anni) che svolgevano screening di routine a Padova, testate con PCR (*primers* MY09/MY11) il 7,2% è risultato positivo.⁴

In uno studio su un campione rettangolare di circa 1000 donne di 25-70 anni aderenti a un programma organizzato a Torino e testati mediante PCR (*primers* GP5+/6+) la prevalenza complessiva, per tutti i tipi, era l'8,8% e quella per tipi oncogeni il 7,1%.⁵ Questi valori si pongono a livello intermedio in Europa ma superiore a quelli d'altri paesi dell'Europa meridionale (3% in Spagna,⁶ 2,5% in Grecia⁷). A livello internazionale le prevalenze standardizzate per età in donne di età 15-74 anni presentano grandi variazioni, tra il 2% di Hanoi, Vietnam⁸ e il 26% di Ibadan, Nigeria.⁹

I dati certamente più rappresentativi a livello italiano derivano dal trial randomizzato NTCC (Nuove tecnologie per lo screening del cancro cervicale, vedi oltre). In tale ambito oltre 45.000 donne di 25-60 anni, aderenti a 9 programmi di screening organizzato (Torino, Trento, Padova,



Verona Soave, Bologna, Imola, Ravenna, Firenze e Viterbo) sono state testate con Hybrid Capture 2 (HC2) che individua 12 tipi di HPV a rischio medio-alto. Nei dati sulla prima fase di reclutamento, in cui il 77% delle donne presentatesi per lo screening sono state reclutate, la proporzione di positive era complessivamente il 9,0%^{10,11} e diminuiva con l'età in modo praticamente lineare dal 16% nella fascia 25-29 al 4,5% nella fascia 55-60 (figura 1). Questo trend corrisponde a un andamento tipico dei paesi sviluppati, in particolare in Europa^{6,12,13} e in Nord America.^{14,15} E' da notare tuttavia che tale profilo per età non è una costante universale. In un'analisi *pooled* degli studi trasversali coordinati dalla IARC¹⁶ una riduzione della prevalenza con l'età si osservava, oltre che in Italia (Torino), in Olanda, Spagna, Corea e Argentina. Tuttavia, in diversi paesi latino americani (Cile, Colombia e Messico) si osservava un secondo picco in età post-menopausale, mentre in una serie di paesi in via di sviluppo (aree rurali in India e in Cina, Nigeria) la prevalenza era sostanzialmente simile in tutte le età. La prevalenza è il risultato della dinamica d'acquisizione e *clearance* dell'infezione. I dati del trasversale torinese⁵ mostrano un profilo differenziato per donne nubili (con livelli elevati fino ai 35-44 anni e una successiva discesa molto pronunciata) e sposate (con livelli molto più bassi in giovane età e una successiva diminuzione molto modesta) suggerendo che la riduzione complessiva nella popolazione sia largamente spiegata da modifiche di comportamento con l'età. Tuttavia, una riduzione si osservava anche nella sposate e potrebbe essere dovuta all'immunità acquisita. In uno studio¹⁷ la prevalenza diminuiva con l'età a parità di numero di partner. D'altro canto la va-

riabilità dei profili per età a livello internazionale impone cautela nell'interpretarli in chiave di storia naturale. Per esempio, il secondo picco post-menopausale è stato interpretato come risultato della riattivazione di infezioni latenti¹⁸ ma il fatto che si osservi solo in alcuni paesi pare contraddittorio. Certamente esistono degli importanti effetti di coorte. Questi potrebbero spiegare anche parte del trend discendente con l'età nei paesi sviluppati ed essere legati a mutamenti delle abitudini sessuali nelle coorti più giovani¹⁶. In tal caso è da attendersi un aumento di rischio di cancro (Ca) cervicale nelle coorti attualmente più giovani man mano che invecchiano. Un aumento di rischio di cancro cervicale nelle coorti più giovani è stato di fatto osservato in alcuni paesi^{19,20} ma per ora non in Italia, dove però il trend a discendere per anno di calendario è sostanzialmente ridotto nelle età più giovani rispetto alle più anziane.²¹ Dati di tipo longitudinale sono meno comuni anche a livello internazionale e spesso limitati a coorti reclutate in un range di età ristretto, anche se ormai la durata del follow-up è in alcuni casi notevole. Alcune coorti si riferiscono a paesi o gruppi ad alto rischio. L'incidenza mostra valori più elevati nelle ventenni ma anche che ci sono nuove infezioni relativamente frequenti anche oltre i 40 anni.²² Non sono a conoscenza di dati italiani di incidenza a livello di popolazione pubblicati. All'interno dello studio NTCC è in corso l'esecuzione di un nuovo test HC2 in un campione di donne che 3 anni prima, al momento del reclutamento, erano risultate negative. Certamente la grandissima maggioranza delle infezioni da HPV regredisce spontaneamente. Nello studio NTCC in un gruppo di donne di età 25-34 anni positive ad HC2 ma con citologia normale, il 60% si era negativizzato dopo un anno.¹¹

Questo dato di una *clearance* di oltre il 50% in un anno si ritrova consistentemente nella letteratura.²³⁻²⁵ Tuttavia, la durata dell'infezione può essere in alcuni casi molto lunga. Le infezioni che hanno persistito più a lungo hanno una maggiore probabilità di persistere ulteriormente.²⁶ Alcuni dati indicano una maggiore persistenza all'aumentare dell'età.^{22,26,27} Complessivamente l'elevata prevalenza e la breve durata della maggior parte dei casi indicano che l'infezione da HPV è un evento estremamente comune e, nella grande maggioranza dei casi, privo di conseguenze. Infatti, benché la quasi totalità dei casi di tumore cervicale presenti infezione da HPV^{28,29} e i rischi relativi siano molto elevati,³⁰ solo una piccola parte delle infezioni progredisce verso il tumore. Di fatto solo una parte delle donne con infezione da HPV presenta alterazioni morfologicamente identificabili delle cellule cervicali: nello studio NTCC il 61% delle donne di età 25-34 positive ad HC2¹¹ e il 71% di quelle di età 35-60¹⁰ presentava citologia normale. Al contrario, solo una parte delle donne con alterazioni interpretate come *borderline* (Atypical Cells of Undetermined Significance, ASCUS) o di basso grado (Low Grade Squamous Intraepithelial lesions, LSIL) presentano di fatto infezione da HPV, in particolare da tipi a rischio medio-alto. Tale proporzione diminuisce con l'età come nelle donne con citologia normale. Nello studio NTCC il 45% delle donne di età 25-34 anni con citologia ASCUS e il 72% di quelle con LSIL era positivo a HC2, mentre nelle donne di età 35-60 le proporzioni corrispondenti erano il 24% e il 42% rispettivamente.³¹ Tali alterazioni citologiche sono di solito associate alla fase proliferativa dell'infezione e compaiono a intervallo breve: sempre nello studio NTCC, in un gruppo di 339 donne di età 25-34, che al reclutamento erano risultate HPV positive ma citologicamente normali e sono state richiamate a un anno, il 40% di quelle rimaste positive aveva sviluppato alterazioni citologiche, nella quasi totalità ASCUS o LSIL.¹¹ Anche le lesioni istologicamente confermate di basso grado (CIN1) paiono comparire a intervalli dell'ordine di mesi dopo l'infezione.³² Queste ultime regrediscono in gran parte spontaneamente.³³

La persistenza dell'infezione è certamente necessaria per la comparsa di lesioni di alto grado.^{25,34} I dati di occorrenza delle lesioni di alto grado, che sono asintomatiche, derivano sostanzialmente dall'attività di screening e sono condizionati, anche riferendosi alle sole donne sottoposte a screening, dalla frequenza dei test e dalla loro sensibilità. Comunque l'occorrenza è chiaramente molto inferiore a quella dell'infezione da HPV. Nei programmi di screening organizzati italiani, dove l'intervallo è triennale, la proporzione di donne sottoposte a screening che ha una lesione di alto grado identificata in un episodio (*detection rate*) è intorno a 0,3%.³⁵ L'intervallo osservato tra infezione e comparsa di lesioni di alto grado dipende dal metodo impiegato per l'identificazione delle stesse, dalla frequenza di test e dall'età. In *teenagers* testate intensivamente si è osser-

vata un'elevata frequenza a breve intervallo dall'infezione.³⁶ Peraltro, in donne in età di screening testate agli intervalli usuali l'intervallo tra infezione e individuazione della lesione mediante citologia è risultato molto lungo.³⁷⁻³⁹ Uno di questi studi ha stimato una durata mediana di 7-12 anni tra infezione e individuazione di un Ca in situ³⁷.

La distribuzione dei tipi di HPV nella popolazione generale presenta variazioni a livello internazionale. I tipi oncogeni e il particolare il tipo 16 sono comunque in generale i più comuni anche nella popolazione generale. Nello studio trasversale torinese, i tipi oncogeni erano presenti nell'81% delle donne infette e HPV 16 nel 33%. In un'analisi *pool*⁴⁰ tale frequenza risultava la più alta tra i paesi europei considerati e la frequenza relativa di HPV 16 tra le infette risultava più alta in Europa rispetto agli altri continenti. Nello studio genovese il 57% delle positive era portatrice di HPV 16, in quello condotto a Brescia oltre il 25%, in quello di Padova il 18%. La tipizzazione dei casi positivi per HC2 nello studio NTCC fornirà un'ampia panoramica della distribuzione dei tipi in Italia.

HPV 16, rispetto agli altri tipi, presenta una aumentata persistenza⁴¹ e, insieme ad HPV 18, è legato a un'incidenza di lesioni di alto grado decisamente maggiore degli altri tipi oncogeni.⁴² Come conseguenza questi tipi sono presenti, a livello mondiale, nel 41-57% delle lesioni di alto grado e nel 65-77% dei tumori invasivi.⁴³ Non sono al corrente di studi rappresentativi sulla distribuzione dei tipi di HPV nei Ca in Italia. In uno studio condotto a Firenze su 117 donne, con CIN2+ identificato nel corso dello screening, il 67% presentava HPV 16.⁴⁴ Nuovamente, la tipizzazione dei casi di NTCC fornirà plausibilmente dati rilevanti rispetto alle prime. Per ottenere un panorama completo in vista della disponibilità del vaccino, il Ministero della salute ha finanziato studi di prevalenza e tipizzazione in aree del Sud e Isole e nelle donne di età 18-24 anni.

Utilizzo della ricerca molecolare dell'HPV come test di screening

Il ruolo eziologico dell'HPV rispetto alla comparsa dei tumori cervicali, il fatto che virtualmente la totalità degli stessi è attribuibile a infezione da HPV e che la persistenza dell'infezione, come si è detto, è necessaria per lo sviluppo delle lesioni intraepiteliali e poi dei tumori, hanno suggerito il possibile utilizzo della ricerca molecolare della presenza del virus stesso, in particolare del DNA virale, come test di screening. Diversi studi hanno dimostrato un aumento di sensibilità del test HPV, rispetto alla citologia convenzionale, nell'individuare la presenza di lesioni di alto grado.⁴⁵⁻⁴⁷ Essi mostrano che quasi tutte le lesioni di alto grado individuate dalla citologia convenzionale, più un ulteriore numero, vengono individuate anche da test per il DNA virale di tipi oncogeni.⁴⁷ Peraltro, non esiste dimostrazione diretta di una riduzione di incidenza di tumori invasivi. E' possibile che le lesioni di alto grado

individuare dal solo test HPV abbiano una storia naturale diversa da quelle individuate dalla citologia e, in particolare, che siano maggiormente (e possibilmente tutte) regressive. Di fatto, per affrontare questo problema, è necessario condurre indagini che permettano di studiare longitudinalmente la comparsa di nuove lesioni in gruppi di donne testate in modo diverso e gestite (ed eventualmente trattate) sulla base del risultato del test. Invece, gli studi pubblicati fino a poco tempo fa erano basati sul doppio test delle stesse donne. Dato che esse venivano inviate per approfondimenti se almeno uno dei test era positivo, questo approccio non consente paragoni longitudinali tra test. L'Handbook on Cervical Cancer Screening⁴⁷ dell'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) ha valutato che lo screening mediante test HPV, agli stessi intervalli, è almeno altrettanto efficace di quello con la citologia convenzionale, ma ha raccomandato lo svolgimento di studi randomizzati che permettano la valutazione d'efficacia a lungo termine.

Un aspetto rilevante è l'intervallo plausibilmente lungo che intercorre tra infezione da HPV e comparsa di lesioni cervicali di alto grado individuabili dalla citologia, come descritto in precedenza. Questo potrebbe consentire di applicare intervalli di screening prolungati alle donne negative, con chiari vantaggi, tra cui quello di raggiungere una maggiore proporzione di donne nell'intervallo desiderato. Ciò è molto rilevante dato che una proporzione elevata di tumori compare in donne insufficientemente sottoposte a screening.

È stato avviato uno studio multicentrico italiano, controllato e randomizzato, lo studio NTCC di cui si è detto sopra, con l'obiettivo di studiare gli effetti a medio termine dello screening basato sulla ricerca molecolare dell'HPV sull'occorrenza di lesioni di alto grado. Esso si pone anche l'obiettivo di definire, per il test HPV, l'età d'inizio e termine migliori, le migliori condizioni di applicazione e le migliori politiche di gestione delle donne positive, tenendo conto dei costi (in termini di numero e tipo di test necessari) e degli effetti indesiderati.

Il progetto, come detto, è condotto entro programmi di screening organizzati, attivi in sei Regioni italiane. Questo garantisce la trasferibilità dei risultati, ottenuti, quindi, in una situazione molto simile a quella di una eventuale futura applicazione routinaria. Studi randomizzati di simile concezione sono in corso in Svezia, Olanda, Finlandia, Regno Unito e Canada e hanno cominciato a fornire dati di base^{48,49} o dati di accuratezza al reclutamento.^{13,50,51}

Le donne eleggibili (di età tra 25 e 60 anni, non isterectomizzate e senza precedenti interventi per Ca o lesioni intraepiteliali cervicali presentatesi per lo screening su chiamata) sono state assegnate casualmente a uno di due bracci: convenzionale o sperimentale. Le donne assegnate al braccio convenzionale hanno eseguito un esame citologico convenzionale. Il braccio sperimentale ha seguito due fasi. Nella prima le donne hanno fatto un prelievo in fase liquida, testato sia

per HPV (mediante Hybrid Capture 2, solo per i tipi cosiddetti a rischio alto e intermedio) e per citologia in strato sottile. Le donne di età maggiore di 35 anni sono state inviate in colposcopia se la citologia era almeno ASCUS oppure se il test HPV era positivo, indipendentemente dal risultato citologico. Le donne di età inferiore ai 35 anni, invece, sono state inviate direttamente in colposcopia solo se la citologia era almeno ASCUS. In questa fascia di età, le donne positive al test HPV ma negative alla citologia sono state inviate a ripetere entrambi i test dopo un anno e inviate in colposcopia solo se alla ripetizione l'HPV era ancora positivo oppure la citologia si era positivizzata. Lo scopo era di aumentare la specificità in una fascia di età in cui la prevalenza di infezioni è, come si è detto, più elevata. Nel corso della seconda fase, invece, le donne assegnate al braccio sperimentale hanno eseguito il solo test HPV come test di screening.

Sono state reclutate circa 95.000 donne. Sono stati pubblicati i risultati relativamente alla riproducibilità del test HPV, che è risultata molto elevata⁵² e riguardo alla sensibilità e al valore predittivo dei test usati o di loro combinazioni durante la prima fase di reclutamento che, complessivamente, ha riguardato 45.307 donne.

Nella fascia d'età tra 35 e 60 anni¹¹ il 7,1% delle donne del braccio sperimentale sono risultate positive al test HPV. Si è osservato un aumento di sensibilità per le lesioni d'alto grado (CIN II o più gravi secondo una revisione in cieco dell'istologia) del test HPV di circa il 50% rispetto alla citologia convenzionale (sensibilità relativa 1,43; IC 95% 1,00-2,04) ma una diminuzione del Valore predittivo positivo (VPP relativo 0,58; IC 95% 0,33-0,98). Un cut-off di 2 RLU ha migliorato sostanzialmente il VPP (VPP relativo 0,75; IC 95% 0,45-1,27) lasciando praticamente invariata la sensibilità relativa (1,41; IC 95% 0,98-1,02). L'aggiunta della citologia liquida al test HPV ha aumentato la sensibilità relativa in modo trascurabile (1,47; IC 95% 1,03-2,09) ma ha ridotto di molto la specificità (VPP relativo 0,40; IC 95% 0,23-0,66). Le donne di età tra 25 e 34 anni, come detto, avevano seguito un diverso protocollo, che mirava a mantenere una buona specificità nonostante l'attesa alta prevalenza d'infezione. In effetti, nonostante in questo gruppo di età il 14% delle donne del braccio sperimentale fosse HPV positivo, il test HPV da solo, utilizzato come descritto sopra, ha mostrato un aumento di sensibilità simile a quello osservato nel gruppo di età superiore, dove le positive venivano inviate direttamente in colposcopia (sensibilità relativa alla citologia convenzionale di 1,58; IC 95% 1,03-2,44) con una riduzione modesta del VPP rispetto alla citologia convenzionale (VPP relativo 0,78; IC 95% 0,72-1,16). Utilizzando un cut-off di 2 RLU e criteri di invio in colposcopia più ristretti al momento della ripetizione (invio solo se entrambi i test erano positivi) la sensibilità era praticamente immutata (sensibilità relativa alla citologia convenzionale 1,55; IC 95% 1,01-2,40) ma il VPP era addirittura simile a quello della citologia convenzionale (VPP

relativo 1,02; IC 95% 0,69-1,52). Anche in questa età l'aggiunta sistematica della citologia liquida al test HPV aumentava la sensibilità relativa in modo trascurabile (1,61; IC 95% 1,05-2,48) ma faceva diminuire in modo notevole il VPP relativo (0,55; IC 95% 0,37-0,82).¹¹

Finora, complessivamente, i dati dello studio NTCC hanno permesso di definire chiaramente alcuni aspetti rilevanti del modo migliore di condurre uno screening che includa il test HPV come test primario:

- il test HPV dovrebbe essere utilizzato da solo, senza aggiunta sistematica della citologia;
- usando Hybrid Capture 2 il *cut-off* migliore è a 2 RLU (2pg/ml di DNA virale);
- utilizzando il test HPV come test di screening e la citologia come test di *triage* delle positive all'HPV si ottiene un vantaggio di sensibilità rispetto alla citologia convenzionale senza praticamente perdita di specificità perfino nelle donne tra 25 e 34 anni, dove la frequenza d'infezione è elevata. Quest'approccio è plausibilmente il migliore anche nelle donne d'età superiore.

Come detto, saranno rilevanti i dati longitudinali, che derivano dal successivo round di screening, tuttora in corso. Le donne «negative» al reclutamento di entrambi i bracci vengono attualmente invitate dopo 3 anni per una citologia convenzionale. Questi dati permetteranno di trarre conclusioni sulla possibilità di prolungare intervalli tra test HPV negativi se si osserverà una forte riduzione del tasso d'identificazione di lesioni di alto grado nel braccio sperimentale. Inoltre, i dati sul follow-up dei due interi bracci (incluse le «positive» al reclutamento) permetteranno di valutare in che misura le lesioni in eccesso trovate dal test HPV sono persistenti.

Le linee guida italiane⁵³ ed europee⁵⁴ raccomandano l'uso della citologia come test primario nell'attività di routine, al di fuori di progetti controllati, in attesa dei risultati, anche longitudinali, dei trial in corso. La prossima disponibilità di vaccini profilattici per HPV 16 o 18, avrà certamente un impatto rilevante sull'epidemiologia dei tumori cervicali e delle lesioni intraepiteliali e quindi sullo screening. La riduzione della prevalenza di lesioni di alto grado comporterà certamente una riduzione del VPP. L'effetto potrebbe essere maggiore riguardo alla citologia, che è altamente soggettiva, rispetto al test per l'HPV, che è molto riproducibile.⁵² Ciò potrebbe rappresentare un'ulteriore spinta per l'introduzione del test HPV. Sarà comunque necessario definire il modo migliore di condurre lo screening nell'era vaccinale, tenendo conto anche del rapporto costi-benefici. La minore incidenza di lesioni di alto grado nei tipi diversi da 16 e 18⁴² potrebbe permettere un ulteriore allungamento degli intervalli tra test. Si sta progettando uno studio orientato a fornire informazioni in proposito.

Ringraziamenti. Lo studio NTCC è stato finanziato dall'UE (Europe against Cancer contracts SI.2.327046 and SPC.2002475), dal Ministero della salute (progetti di ricerca finalizzata e L138/2004), dalla Compagnia di S. Paolo FIRMS e dalle Regioni partecipanti.

Bibliografia

- 1 Ronco G, Segnan N, Giordano L, Pilutti S, Senore C, Ponti A, Volante R. Interaction of spontaneous and organised screening for cervical cancer in Turin, Italy. *Eur J Cancer* 1997; 8: 1262-67.
- 2 de Sanjosé S, Almirall R, Lloveras B, Font R, Diaz M, Muñoz N et al. Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 788-93.
- 3 Agorastos T, Bontis J, Lambropoulos AF, Constantinidis TC, Natsioutziki M, Tagou C, Katsouyiannopoulos V. Epidemiology of human papillomavirus infection in Greek asymptomatic women. *Eur J Cancer Prev* 1995; 4: 159-67.
- 4 Centurioni MG, Puppo A, Merlo D, Pasciuccio G, Cusimano E, Sirito R, Gustavano C. Prevalence of human papillomavirus cervical infection in an Italian asymptomatic population. *BMC Infectious Diseases* 2005; 5: 77.
- 5 De Francesco MA, Gargiulo F, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaio F, Manca N. Detection and genotyping of human papillomavirus in cervical samples from Italian patients. *J Med Virol* 2005; 75: 588-592.
- 6 Del Mistro A, Bonaldi L, Retorelle R et al. Genital Human papillomavirus types in immunocompetent and immunodepressed women in Northeast Italy: prevalence and cytological correlations. *J Lower Genital Tract Dis* 2001; 5: 12-20.
- 7 Ronco G, Ghisetti V, Segnan N, Snijders PFJ, Gillio-Tos A, Meijer CJLM et al. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy. *Eur J Cancer* 2005; 41: 297-305.
- 8 Ahn PTH, Hieu NT, Herrero R, Vaccarella S, Smith JS, Thuy NT et al. Human papillomavirus infection among women in South and North Vietnam. *Int J Cancer* 2003; 104: 213-20.
- 9 Thomas JO, Herrero R, Omigbodun AA, Ojemakinde K, Ajayi IO, Fawole A et al. Prevalence of papillomavirus infection in Ibadan, Nigeria: a population-based study. *Brit J Cancer* 2004; 90: 638-645.
- 10 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.
- 11 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.
- 12 Jacobs MV, Walboomers JM, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Verheijen RH, Franssen-Daalmeijer N, Meijer CJ. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: The age related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer* 2000; 87: 221-27.
- 13 Kitchener HC, Almonte M, Wheeler P, Desai M, Gilham C, Bailey A et al. HPV testing in routine cervical screening: cross sectional data from the ARTISTIC trial. *Br J Cancer* 2006; 95: 56-61.
- 14 Sellors JW, Mahony JB, Kaczorowski J, Lytwyn A, Bangura H, Chong S et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. *Can Med Assoc J* 2000; 163: 503-08.
- 15 Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, Markowitz LE. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007; 297: 813-19.
- 16 Franceschi S, Herrero R, Clifford G, Snijders PJF, Arslan A, Anh PTH et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer* 2006; 119: 2677-84.
- 17 Burk RD, Kelly P, Feldman J, Bromberg J, Vermund SH, Dehovitz JA, Landerman SH. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis* 1996; 23: 333-41.
- 18 Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 464-74.
- 19 Anttila A, Pukkala E, Soderman B, Kallio M, Nieminen P, Hakama M. Effect of organised screening on cervical incidence and mortality in

- Finland 1963.1995: recent increase in cervical cancer incidence. *Int J Cancer* 1999; 83: 59-65.
- 20 Peto J, Gilham C, Fletcher O, Mattewa FE. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet* 2004; 364: 249-56.
- 21 Zambon P, La Rosa F. Tumori ginecologici: cervice, corpo dell'utero ovaio. In Crocetti E, Capocaccia R, Casella C, Ferretti S, Guzzinati S, Rosso S et al. eds. Gli andamenti temporali della patologia oncologica in Italia: i dati dei Registri tumori (1986-1997). *Epid-Prev* 2004; 28 (suppl 2): 68-74.
- 22 Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, Rohan TE. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180:1415-23.
- 23 van Duin M, Snijders PJF, Schrijnemakers HFJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MAE et al. Human papillomavirus 16 load and abnormal cervical scrapes: an indicator of CINII/III and viral clearance. *Int J Cancer* 2002; 98: 950-59.
- 24 Molano M, van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology; a population based 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 2003; 158: 46-94.
- 25 Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural History of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-28.
- 26 Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005; 19: 1808-16.
- 27 Ho GYF, Burk RD, Klein S et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1365-71.
- 28 Bosch FX, Manos MM, Muñoz et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
- 29 Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19.
- 30 Munoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellaugué X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
- 31 Ronco G, Cuzick J, Segnan N, Brezzi S, Carozzi F, Folicaldi S et al. 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.
- 32 Liaw KL, Glass AG, Manos MM, Greer CE, Scott DR, Sherman M et al. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 1999; 9: 954-60.
- 33 Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 89: 88-93.
- 34 Nobbenhuis M, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM et al. Relation of human papillomavirus to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354: 20-25.
- 35 Ronco G, Giubilato P, Naldoni C, Zorzi M, Anghinoni M, Scalisi A, et al. Extension of cervical cancer screening programmes in Italy and their process indicators. *Epidemiol Prev* 2007 in press.
- 36 Woodman CI, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P et al. Natural History of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal study. *Lancet* 2001; 357: 1831-36.
- 37 Ylitalo N, Josefsson AM, Melbye M, Sorensen P, Frisch M, Krag Andersen P et al. A prospective study showing long-term infection with papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res* 2000; 60: 6027-32.
- 38 Carozzi F, Ronco G, Confortini M, Noferini D, Maddau G, Ciatto S, Segnan N. Prediction of high grade cervical intraepithelial neoplasia in cytologically normal women by human papillomavirus testing. *Brit J Cancer* 2000; 83: 1462-67.
- 39 Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S et al. Baseline cytology, human papillomavirus testing and risk of cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 46-52.
- 40 Clifford G, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJF, Vaccarella S et al. Worldwide distribution of HPV types in cytologically normal women: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Lancet* 2005; 366: 991-98.
- 41 Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC et al. The carcinogenicity of human papillomavirus type-specific viral evolution. *Virology* 2005; 337: 76-84.
- 42 Kahn MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 1 and the possible utility of type specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1072-79.
- 43 Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; 24S3: S3/26-S3/34.
- 44 Carozzi F, Confortini M, Cecchini S, Bisanzzi S, Cariaggi MP, Pontenani G et al. Triage with human papillomavirus testing of women with cytological abnormalities prompting referral for colposcopic assessment. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 2005; 105: 2-7.
- 45 Cuzick J, Sasieni P, Davies P et al. A systematic review of the role of human papillomavirus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. *Brit J Cancer* 2000; 83: 561-65.
- 46 Cuzick J. Role of HPV testing in clinical practice. *Virus Research* 2002; 89: 263-69.
- 47 International Agency for Research on Cancer. *Cervical cancer screening*. IARC Handbooks on Cancer prevention No 10. Lyon, 2005.
- 48 Bulkman NW, Rozendaal L, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Boeke AJ, Zandwijken GR et al. POBASCAM, a population-based randomised control trial for implementation of high-risk HPV testing in cervical screening: design, methods and baseline data of 44,102 women. *Int J Cancer* 2004; 110: 94-101.
- 49 Mayrand MH, Duarte-Franco E, Coutlee F, Rodrigues I, Walter SD, Ratnam S et al. Randomised controlled trial of human papillomavirus testing versus Pap cytology in the primary screening for cervical cancer precursors: design, methods and preliminary accrual results of the Canadian cervical cancer screening trial (CCCST). *Int J Cancer* 2006; 119: 615-23.
- 50 Elfgrén K, Rylander E, Radberg T, Strander B, Strand A, Paajanen K et al. Colposcopic and histopathologic evaluation of women participating in population-based screening for human papillomavirus deoxyribonucleic acid persistence. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 650-57.
- 51 Kotaniemi-Talonen L, Nieminen P, Anttila A, Hakama M. Routine screening with primary HPV testing and cytology triage protocol in a randomised setting. *Int J Cancer* 2005; 93: 862-67.
- 52 Carozzi F, Del Mistro A, Confortini M, Sani C, Puliti D, Trevisan R et al. 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.
- 53 Ministero della Salute. *Screening oncologici. Raccomandazioni per la pianificazione e l'esecuzione degli screening di popolazione per la prevenzione del cancro della mammella, del cancro della cervice uterina e del cancro del colon-retto*. Roma 2006.
- 54 Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, Wiener H, eds. European guidelines for quality assurance on cervical cancer screening. 2 ed. Brussels: *European Community* in press.