
S4.3

DIAGNOSI MOLECOLARE DELLE INFEZIONI GENITALI DA PAPILOMAVIRUS (HPV)

Cattani P.

Istituto di Microbiologia, Dipartimento di Diagnostica Morfologica, Microbiologica, Molecolare e delle Malattie del Sangue, Università Cattolica, Roma

Tra i virus trasmessi per via sessuale i Papillomavirus umani (HPV) occupano un posto importante sia per l'elevata frequenza delle infezioni nella popolazione generale che per la significativa associazione con la patologia neoplastica cervicale.

La persistenza dell'infezione da HPV viene indicata come uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di carcinoma della cervice uterina. In particolare, l'attività oncogena espressa dalle due proteine virali E6 ed E7 è molto più efficiente in alcuni genotipi di HPV che per questo sono stati classificati "ad alto rischio" per l'associazione con quelle anomalie cellulari che presentano una variabile potenzialità di evoluzione verso il carcinoma invasivo.

La diagnosi di laboratorio delle infezioni da HPV utilizza esclusivamente metodiche molecolari per la ricerca e l'eventuale genotipizzazione di acidi nucleici virali nel materiale biologico proveniente dalla sede della lesione.

I quesiti diagnostici principali che il laboratorio di virologia clinica deve contribuire a chiarire riguardano essenzialmente l'identificazione di un'infezione attiva, la dimostrazione di una persistenza dell'infezione, in particolare da genotipi "ad alto rischio", e l'individuazione dell'attività oncogena associata all'espressione genica virale.

La valutazione del risultato di un test diagnostico per la ricerca del genoma virale deve tener conto del fatto che, sebbene la presenza di DNA di HPV "ad alto rischio" sia generalmente associata ad un aumento del rischio di trasformazione cellulare indotta da HPV, la maggior parte di queste infezioni è naturalmente transitoria e non significativa dal punto di vista clinico e solo in una piccola percentuale di casi la lesione evolve lentamente verso un carcinoma della cervice. Inoltre, per stabilire la persistenza dell'infezione è necessario poter escludere la frequente possibilità di una nuova infezione.

Alla luce di queste considerazioni verranno presentate le più recenti metodiche disponibili per la ricerca di HPV sia come determinazione qualitativa sia come genotipizzazione, valutando vantaggi e svantaggi dei diversi approcci diagnostici ed il loro significato dal punto di vista clinico.

Più recentemente, l'applicazione di metodiche moleco-

lari per la determinazione quantitativa degli acidi nucleici ha offerto alla diagnostica degli HPV nuovi strumenti, valutabili nell'ottica di una valutazione prognostica dell'infezione da Papillomavirus. Verrà quindi discusso il significato e il valore delle più recenti metodiche quali la determinazione quantitativa del DNA di Papillomavirus, mediante Real-time PCR, e dell'RNA espressione degli oncogeni virali E6 ed E7 mediante Real-time RT-PCR. La ricerca dei trascritti E6 ed E7, associata alla determinazione del DNA virale, sembra significativa per l'identificazione di un'infezione persistente nella quale la perdita della normale regolazione dell'espressione genica virale indica una probabile progressione della lesione.

La determinazione di mRNA virali, così come la ricerca di altri marcatori, virali e/o cellulari, dell'attività del virus e del suo potenziale oncogeno, costituiscono i principali obiettivi verso i quali è indirizzata la ricerca molecolare applicata alla diagnostica di laboratorio delle infezioni da Papillomavirus.

S4.4

MARKERS MOLECOLARI NELLA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA HPV GENITALI

Zerbini M.

Sez. Microbiologia, Dip. Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale, Univ. di Bologna

In questi ultimi anni l'utilizzo di test molecolari per la ricerca di HPV ad alto rischio oncogeno ha trovato ampia diffusione come strumento diagnostico fondamentale per l'implementazione dell'esame citologico nella prevenzione del carcinoma del collo dell'utero e nel follow up di pazienti trattate per lesioni di alto grado.

Infatti, dagli studi epidemiologici emerge che la persistenza d'infezioni da HPV ad alto rischio oncogeno precede e predice lo sviluppo in senso maligno delle lesioni squamose intraepiteliali. Inoltre altri fattori quali: un'alta carica di DNA di HPV ad alto rischio oncogeno nei campioni cervicali, lo stato fisico integrato del DNA virale nel genoma cellulare e l'espressione degli oncogeni E6/E7 sembrano avere un valore diagnostico e prognostico.

Studi epidemiologici sono stati compiuti, in gran parte, mediante saggi di ibridazione con amplificazione del segnale chemiluminescente (Hybrid Capture, Digene) e saggi molecolari, che si basano sull'amplificazione di diverse sequenze geniche di HPV e successiva tipizzazione genotipica mediante enzimi di restrizione o saggi di ibridazione con sonde tipo-specifiche. Più recentemente sono stati utilizzati inoltre saggi quantitativi di real-time PCR per la ricerca, la tipizzazione e

la quantificazione del DNA virale e degli mRNA.

Nel laboratorio diagnostico i saggi di PCR impiegati utilizzano prevalentemente coppie di primer "di consenso" che consentono l'amplificazione di sequenze genomiche di molteplici genotipi di HPV. La maggior parte dei primer di consenso utilizzati nella diagnosi di infezione da HPV sono localizzati nelle regioni L1 ed E6/E7 del genoma degli HPV, essendo entrambe le regioni altamente conservate. I prodotti di PCR ottenuti con i primer di consenso vengono poi generalmente ibridati con sonde oligonucleotidiche tipospecifiche che oltre ad aumentare la sensibilità del metodo sono in grado di definire il genotipo virale.

Lo sviluppo di tecniche di PCR real-time quantitativa ha consentito di ampliare considerevolmente la rilevanza diagnostica della presenza di acidi nucleici virali in un campione clinico, una genotipizzazione è possibile sia utilizzando primer specifici sia sonde genotipo-specifiche. Una PCR real-time quantitativa è in grado di fornire informazioni sulla presenza e tipizzazione del DNA virale e sulla carica virale. Inoltre mediante analisi quantitativa del rapporto numerico tra i geni E2/E6 è possibile determinare lo stato fisico del DNA di HPV, differenziando lo stato episomale rispetto allo stato integrato, indicativo di progressione neoplastica della lesione. L'analisi dei trascritti di E6/E7 si è rivelata inoltre uno strumento utile per definire la persistenza e l'espressione delle infezioni da HPV ad alto rischio e quindi per identificare pazienti a rischio di progressione di malattia.

Concludendo quindi abbiamo a disposizione tecniche molecolari raffinate che ci permettono di diagnosticare non solo la presenza di HPV ad alto rischio oncogeno nel campione in esame, ma mediante lo studio della carica virale, dello stato fisico e dell'espressione dei mRNA ci possono fornire informazioni sulla possibile evoluzione della malattia.

S4.5

INFEZIONI DEL VIRUS BK NEL TRATTO URINARIO

Corallini A.

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università degli Studi, Ferrara

Il virus BK (VBK), un papovavirus umano, è stato isolato per la prima volta nel 1971 da un paziente che aveva sviluppato una stenosi dell'uretere dopo un trapianto renale.

In seguito altri isolamenti del virus sono stati fatti da individui immunosoppressi a seguito di un trapianto renale o di midollo osseo. Indagini sierologiche hanno dimostrato che il virus è distribuito in tutto il mondo e la prima infezione si manifesta già nella prima età: a

tre anni il 50% dei bambini ha anticorpi contro il VBK e la percentuale di individui positivi raggiunge il 90% negli adulti. L'infezione primaria è di solito asintomatica e solo occasionalmente può essere accompagnata da una moderata infezione delle vie respiratorie o del tratto urinario. Durante l'infezione primaria si manifesta una viremia e il virus si diffonde in diversi organi, dove rimane in uno stadio di latenza.

Studi clinici, realizzati in individui immunosoppressi e immunocompetenti, indicano che la riattivazione di VBK dalla latenza è associata soprattutto con un stato di immunodeficienza immunologica. Con diverse tecniche di analisi è stato osservato che il rene rappresenta il principale sito di latenza del virus in individui sani, anche se sequenze virali sono state trovate in altri organi, quali il fegato, lo stomaco, i polmoni e i linfonodi. Poco è conosciuto circa la modalità di trasmissione del virus e di accesso ai tessuti, anche se l'infezione delle prime vie respiratorie durante il primo contatto con il virus e la presenza di DNA virale nelle tonsille indicano che la via di trasmissione più probabile possa essere quella orale.

La riattivazione di VBK è stata osservata nelle urine di individui immunosoppressi a seguito di un trapianto di rene o di midollo osseo, nelle urine di donne gravide e in pazienti con immunodeficienza ereditaria o acquisita. Tale riattivazione può indurre manifestazioni infiammatorie, che colpiscono diversi organi. In particolare è stato osservato che trapiantati renali hanno manifestato una nefrite (2,5%), una occlusione dell'uretere (72%) e in alcuni casi il rigetto dell'organo. Inoltre è stata descritta un'associazione fra cistite emorragica e VBK in pazienti che hanno ricevuto il trapianto del midollo osseo. Così pure diversi ricercatori hanno descritto gravi disfunzioni in pazienti che, a seguito di un trapianto renale, hanno manifestato una necrosi dei tubuli renali a causa di una ampia replicazione di VBK nell'epitelio degli stessi tubuli.

S4.6

INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS: IMPLICAZIONI CLINICO-DIAGNOSTICHE

Lazzarotto T., Landini M.P.

U.O. di Microbiologia, Laboratorio di Virologia, Policlinico S.Orsola Malpighi, Università degli Studi di Bologna, Bologna.

Il Citomegalovirus umano (CMV) è un *Betaherpesvirus* responsabile di infezioni endemiche ed ubiquitarie. Nel corso dell'esistenza dal 40 all'80% degli individui nei Paesi industrializzati e la quasi totalità degli individui nei Paesi in via di sviluppo, va incontro ad infezione da CMV.