

I Papilloma Virus Umani

CARATTERISTICHE GENERALI

I Papilloma virus umani (**Human Papilloma Virus, HPV**), sono stati associati ad un vasto spettro di lesioni benigne ipertrofiche cutanee (condilomi, verruche, papillomi). Tuttavia l'importanza clinica degli HPV deriva dal fatto che sono coinvolti anche nelle insorgenze neoplastiche degli stessi epiteli.

I Papilloma Virus appartengono alla famiglia dei *Papovaviridae*, sono virus a DNA a doppia elica circolare, rivestito da un involucro capsidico.

Sono virus di cui si conosce ancora poco sul ciclo vitale, la dinamica della trasmissione dell'infezione, l'immunologia, le modalità di diagnosi e di terapia.

Dato che gli antigeni virali non sono ancora ben caratterizzati, la tassonomia degli HPV è basata sull'omologia di sequenza del DNA; fino ad oggi sono stati identificati oltre 100 genotipi diversi di HPV.

Questi virus sono considerati **oncovirus** (virus che causano tumori), a causa della loro capacità di trasformare una cellula normale in una cellula indifferenziata.

In generale, dopo qualche mese dall'infezione può comparire una prima lesione, seguita da un'attiva proliferazione virale. A questa può seguire un'attiva risposta immunitaria dell'ospite, che può sfociare in una remissione clinica oppure in una malattia persistente o addirittura ricorrente.

I Papillomavirus si replicano nelle

cellule epiteliali squamose ed il loro ciclo replicativo è dipendente dagli eventi che regolano la maturazione dei cheratinociti. Tipi specifici di HPV tendono ad infettare differenti tipi di epitelio e a produrre diverse manifestazioni cliniche.

Possono dar luogo alle cosiddette verruche, tumori benigni della pelle, ad infezioni dell'apparato ano-genitale o dell'apparato respiratorio ed è ormai confermata la correlazione tra infezione tipo-specifica di HPV e neoplasie (Tabella 1).

INFEZIONI CUTANEE

L'infezione da HPV, trasmessa per contatto diretto, causa la comparsa

delle ben note verruche su mani e piedi.

L'infezione con i tipi 1, 2, 3, e 4 di HPV avviene durante l'infanzia ed è generalmente auto-limitante, senza conseguenze cliniche, mentre HPV 5 ed HPV 8 sono rilevati nell'Epidermodisplasia Verruciforme.

Sono rare le manifestazioni maligne.

PAPILLOMATOSI RESPIRATORIA RICORRENTE

Viene osservata sia nei bambini che negli adulti; è caratterizzata da infiammazione della laringe, associata ad ostruzione delle alte vie respiratorie ed è spesso trasmessa per via perinatale.

Gli HPV 6 e HPV 11 oltre le mucose genitali (condilomi) infettano spesso anche quelle laringee. Inoltre in quest'ultima sede si rileva frequentemente la combinazione: infezione da HPV 13 e carcinoma orale.

Tabella 1

Tipi di HPV	Lesioni
1, 2, 4	verruche plantari
3	verruche piane giovanili
5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19 - 29	epidermodisplasia verruciforme
6, 11, 16	condilomi acuminati
7	verruche dei macellai
10	verruche piane giovanili
13	papillomi orali
16, 18	carcinoma del pene e della cervice
30	carcinoma laringeo

CONDILOMATOSI GENTALE E CANCRO DEL COLLO DELL'UTERO

Il cancro del collo dell'utero è il secondo tipo di tumore maggiormente diffuso, che colpisce le donne (oltre

500.000 casi/anno nel mondo). L'infezione da HPV costituisce uno dei principali fattori di rischio di que-

sto tumore; infatti il DNA di HPV viene riscontrato praticamente in tutti i carcinomi dell'utero ed in tutte le lesioni precancerose, oltre che nel 50% dei tumori ano-genitali.

Nell'ambito delle lesioni premaligne e maligne dell'apparato genitale femminile vari tipi di HPV sono stati correlati ad una diversa capacità evolutiva delle lesioni riscontrate durante il Pap-test e ne è scaturita una classificazione in base alla quale circa una trentina i tipi di HPV sono considerati ad 'alto-rischio' (vedi tabella 2), cioè causa di tumori, mentre altri HPV sono considerati a 'medio-rischio', responsabili di lesioni intraepiteliali squamose (sia HSIL che LSIL), mentre gli HPV a 'basso rischio' sono associati a lesioni genitali e LSIL.

Nel 1988 venne introdotto un protocollo (Bethesda) che classifica in modo meno ambiguo e più semplice le lesioni cervicali definite come **ASCUS** (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance), **LSIL** (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion) che comprende anche le lesioni epiteliali CIN1 e KA [presenza di coilociti] e **HSIL** (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion) che include le lesioni CIN2 e 3.

Inoltre i criteri di rischio di degenerazione delle lesioni tengono conto di tre parametri fondamentali:

1) criteri di designazione di lesioni (alto o basso rischio)

2) correlazioni cito-istologiche derivanti da questi criteri

3) grado di correlazione tra cito-istologia e tipo di HPV

Tale sistema, partendo dalle più recenti associazioni tra certi tipi di HPV ed il potenziale neoplastico delle lesioni ha codificato le capacità predittive della citoistologia associata alla tipizzazione dell'eventuale infettante.

Appare ormai evidente che la ricerca dell'HPV apporta un fondamentale contributo all'analisi delle lesioni cervicali e costituisce un utile strumento per porre una corretta diagnosi, impostare una terapia e il conseguente follow-up delle diverse lesioni.

Anche le neoplasie intraepiteliali cervicali (CIN) ad alto rischio sono associate quasi sempre agli stessi tipi HPV.

Studi prospettici hanno dimostrato infatti che il 15-28% di donne con esame citologico normale, ma positive per **HPV DNA**, sviluppa neoplasia intraepiteliale squamosa entro due anni. In particolare il rischio di evoluzione è risultato maggiore per tipi di HPV ad alto rischio rispetto a quello di altri tipi di HPV.

Durante il Pap test sarebbe quindi necessario rilevare la presenza del virus. La combinazione esame citologico e test **HPV DNA** può ridurre significativamente il rischio che le pazienti sfuggano al controllo per la prevenzione del cancro del collo dell'utero.

Infatti, il virus può determinare un'infezione latente, per cui il portatore non si rende conto di essere stato infettato e può a sua volta trasmettere l'infezione.

E' stato osservato che all'interno di una coppia con paziente HPV-DNA positiva, nell'87% dei casi anche il partner maschile risulta infettato e mentre per la donna possono verificarsi manifestazioni cliniche o sub-cliniche, la popolazione maschile permane generalmente asintomatica.

L'infezione da HPV può guarire spontaneamente, o può causare forme proliferative benigne, i *condilomi genitali*, che possono essere curati in modo efficace e che possono essere sia in forma conclamata, e quindi visibili ad occhio nudo sui genitali, che in forma sub-clinica, presenti anche a livello cervico-vaginale e quindi evidenziati solo con test specifici.

E' stato osservato che i condilomi sono generalmente causati da infezioni da HPV 'a basso rischio'.

In definitiva, le attuali posizioni di consenso internazionali, nell'ambito ginecologico, sottolineano l'importanza della ricerca di HPV-DNA e della sua tipizzazione. In particolare si sollecita l'estensione dell'indagine a quadri citologici incerti e ad ASCUS, per ottenere la massima efficacia nel controllo degli stadi pre-cancerosi.

Tabella 2

Classe	Tipo virale	Lesione genitale associata
Basso rischio	6, 11, 42, 43, 44	Condiloma acuminato
Medio rischio	42 - 45, 51, 52, 56,	Displasia lieve-moderata (LSIL)
Alto rischio	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68	Displasia severa (HSIL), carcinoma invasivo

DIAGNOSI - Marcatori di infezione

Per le infezioni genitali i campioni da utilizzare sono rappresentati generalmente da un brushing cervicale o tampone nella popolazione femminile e lo sperma nella popolazione maschile.

L'analisi cito-istologica fornisce dati morfologici indicativi di una infezione virale in atto e del grado istologico della lesione virale, tuttavia non è ingrado da sola di fornire informa-

zioni sulla presenza dell'HPV, né tantomeno sul genotipo infettante. Infatti, nella fase iniziale dell'infezione l'epitelio appare normale o con lievi atipie.

Nella fase di lesioni a basso grado, si notano alterazioni a livello dei cheratinociti, in particolare con presenza di coilociti, che possono indirizzare l'anatomo patologo verso una possibile diagnosi di infezione da HPV.

Un test per la ricerca dell'HPV nel materiale biotico, si pone quindi come discriminante complemento diagnostico a supporto della diagnosi e dell'eventuale follow-up dell'infezione virale.

Il laboratorio ha a disposizione metodi di immunoriconoscimento, basati sull'utilizzo di anticorpi contro il capsido, specifici per HPV ad alto e basso rischio sessualmente trasmessi per la determinazione degli antigeni virali.

Tuttavia questi metodi, che ancora non mostrano un'adeguata sensibilità analitica sono scarsamente utilizzati come mezzo diagnostico.

Più utile e più diffusa è la conferma della presenza del DNA virale.

Determinazione diretta del virus (Ricerca dell'HPV DNA)

Il DNA dell'HPV può essere ricercato con tecniche molecolari quali l'ibridazione *in situ* o la PCR effettuata

sul materiale derivante dal brushing o tampone cervicale.

Il test più significativo a tal fine è la verifica della presenza di HPV (**HPV DNA**) e l'identificazione della classe d'appartenenza (**alto o basso rischio**) cercando quindi di prevedere le possibili evoluzioni cliniche.

La PCR per la sua specificità e rapidità rappresenta un metodo di elezione per la conferma diagnostica di infezione virale ed inoltre può esse-

re effettuata sul materiale biotico in varie forme.

In un momento successivo può essere eseguita la caratterizzazione del **genotipo virale** infettante che può essere di grande utilità soprattutto negli studi epidermiologici (ad esempio all'interno della coppia.)

Dr.ssa R. Caldarelli

Responsabile Biologia Molecolare-CAM

ELETTROFORESI

Elettroforesi è un termine riferito alla migrazione, in un mezzo di supporto e sotto l'azione di un campo elettrico, di sostanze caratterizzate dalla presenza di una carica.

L'elettroforesi applicata a campioni di siero umano, prende le mosse come tecnologia dagli esperimenti di Tiselius verso la fine degli anni '30.

Nel tempo la metodica elettroforetica si è man mano affinata, soprattutto nelle sue componenti tecniche critiche (es.: tampone di migrazione, mezzo di supporto) fino a diventare una procedura solida, standardizzabile ed automatizzabile che è ormai parte fondamentale della routine del laboratorio clinico.

Le proteine sono molecole polimeriche di aminoacidi, che in particolari condizioni di pH presentano una carica elettrica; quando vengono sottoposte ad un campo elettrico, le proteine si muovono nel mezzo di migrazione con una velocità che dipende dalla loro carica totale, dalle loro dimensioni ed anche dalla loro forma.

Normalmente la tecnica elettroforetica separa e stratifica le proteine del siero umano in cinque zone principali:

Albumine, Alfa 1, Alfa 2, Beta, Gamma.

L'analisi qualitativa e quantitativa

relativa alla distribuzione e separazione delle componenti proteiche (es.: asimmetria di un picco, presenza di un picco aggiuntivo), è di grande utilità clinica, infatti l'elettroforesi delle proteine presenta l'enorme vantaggio che da un singolo test si ottengono molte informazioni.

Tra le metodiche più adottate dal laboratorio biochimico, ricordiamo le tecniche che utilizzano come mezzo di supporto per la migrazione il gel di agarosio oppure l'acetato di cellulosa. Le figure 1 e 2. mostrano degli esempi di migrazione elettroforetica ed la loro densitometria che permette di assegnare un "peso" relativo alle varie zone.

denominato ELETTROFORESI CAPILLARE. Il concetto base dell'elettroforesi è rimasto immutato e viene applicato operando la separazione delle proteine all'interno di un capillare opportunamente selezionato. Il siero del paziente viene fatto migrare, sotto la spinta di un campo elettrico, all'interno di un capillare il cui diametro interno varia da 0,02 a 0,1 mm; durante questa corsa le proteine si stratificano nelle classiche zone, all'interno delle quali, grazie al grande potere risolutivo della nuova metodica è possibile riconoscere alcuni picchi di proteine specifiche.

La figura 3 descrive un tipico

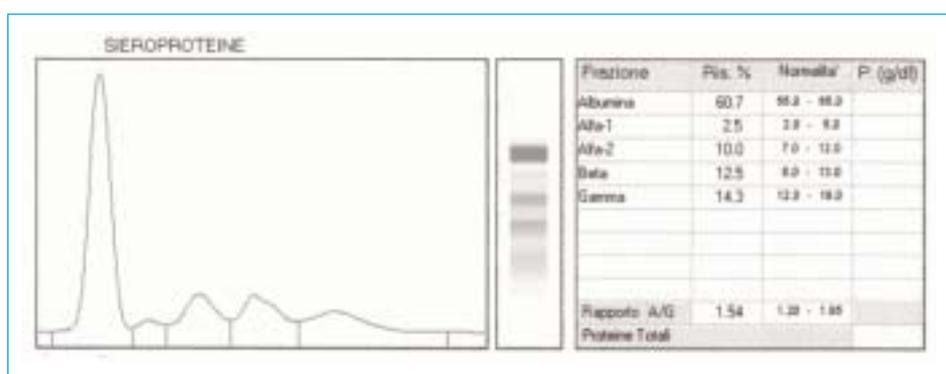


Figura 1

La ricerca di soluzioni tecnologiche sempre più sofisticate nell'ottica di aumentare la risoluzione, cioè di migliorare la separazione delle varie proteine, è sfociata in un sistema

tracciato derivato da un sistema di elettroforesi capillare.

All'interno di un referto elettroforetico mentre le anomalie di tipo quantitativo in una delle cinque zone

sono già diagnosticamente significative, le anomalie qualitative, che normalmente appaiono nella regione Beta e nella regione Gamma devono essere ulteriormente indagate mediante tecniche di Immunofissazione soprattutto per identificare eventuali componenti monoclonali.

Il sistema dell'Elettroforesi Capillare è disegnato per eseguire in automatico una metodica equivalente all'Immunofissazione, denominata **Immunosottrazione** per la rilevazione di componenti monoclonali.

Il siero campione viene messo a contatto con una fase solida che porta legati anticorpi specifici (es.: anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM) che sequestrano le proteine specifiche. Quindi vengono eseguite corse elettroforetiche e dall'analisi comparative dei tracciati è possibile rilevare per "differenza" proteine di tipo monoclonale:

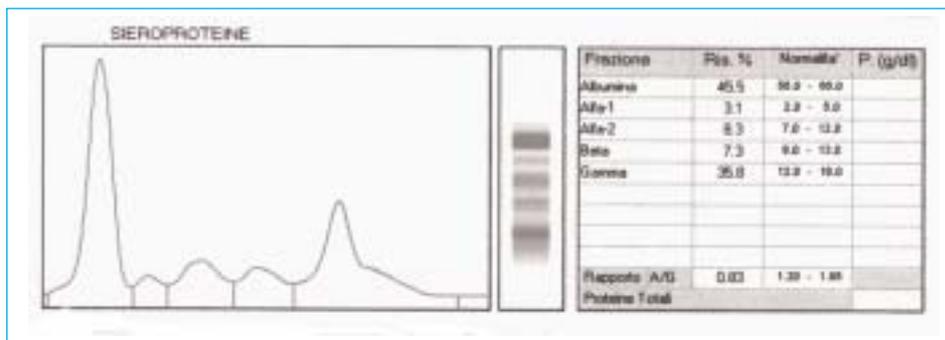


Figura 2

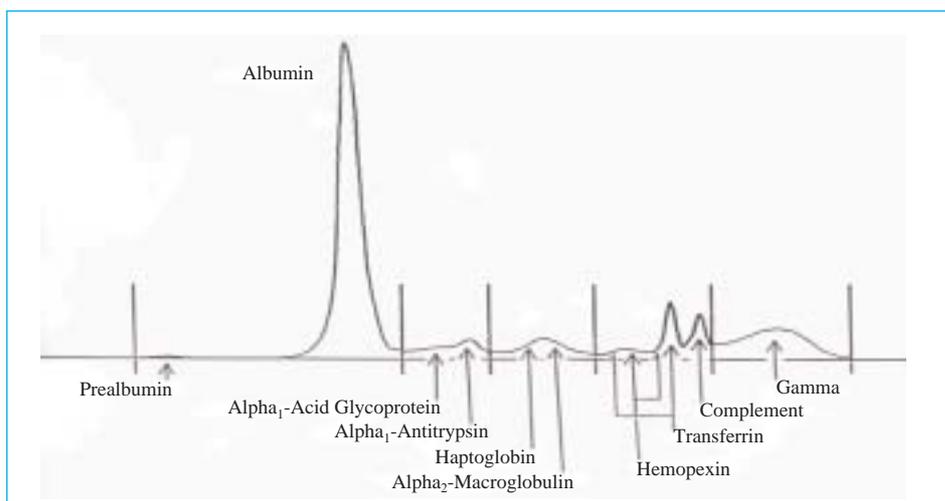
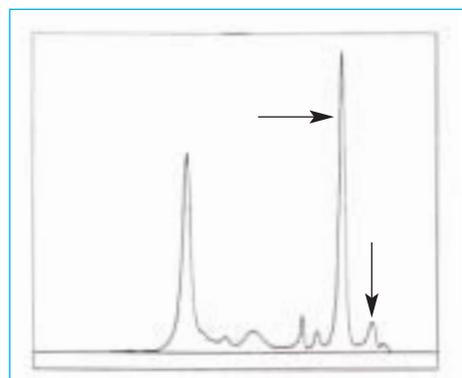


Figura 3



CASO CLINICO

Soggetto con richiesta di Elettroforesi delle proteine nell'ambito di uno screening periodico.

Il tracciato presenta due evidenti anomalie: 1 in regione β ed 1 in regione γ .

Un approfondimento effettuato mediante la misura delle immunoglobuline, è suggestivo di una com-

ponente monoclonale di tipo **IgG λ**

IgG (4170 mg/dl), IgA (34,7 mg/dl), IgM (14,4 mg/dl), kappa (206 mg/dl), lambda (3580 mg/dl)

L'immunosottrazione e l'immunofissazione confermano la presenza di due componenti monoclonali di tipo IgG λ (una che migra in β e l'altra in γ).

cam Centro Analisi Monza

MONZA:

Laboratorio analisi, piazza Trento e Trieste, 11 (tel. 0392397350)
 Centro polidiagnostico, viale Brianza, 21 ang. via Bellini (tel. 0392397.1)
 Sezione ecologia, via Missori, 12 (tel. 0392397247)

BRESSO: via XXV Aprile, 16 (tel. 026104946)

CARUGATE: via Italia, 22 (tel. 0292157477)

CESANO MADERNO: via Como, 4 (tel. 0362540550)

DESIO: via Pozzo Antico, 24 (tel. 0362623156)

SEREGNO: piazza Risorgimento, 21 (tel. 0362234251)

VAREDO: via Italia ang. S. Aquilino (tel. 0362582945)

VILLASANTA: piazza Giovanni XXIII, 12 (tel. 039302366)