

# La reazione polimerasica a catena (PCR) nella diagnosi delle infezioni genitali da Papillomavirus umano (HPV)

Rosanna Masciari<sup>1</sup>, Ignazio Vasapollo<sup>2</sup>, Maria Gabriella Lepore<sup>1</sup>,  
Rosangela De Grazia<sup>1</sup>, Vincenzo Rondinelli<sup>1</sup>, Caterina Filia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Virologia e Microbiologia Azienda Ospedaliera Pugliese - Ciaccio Catanzaro

<sup>2</sup>Microbiologia e Virologia Ospedale Jazzolino ASL n° 8 Vibo Valentia

Polymerase chain reaction (PCR) in laboratory diagnosis of human papillomavirus (HPV) genital infections

**Key words:** Polymerase Chain Reaction, HPV screening, HPV typing, p53 typing

## SUMMARY

In a three year time (2001-2003) we evaluated the use of HPV testing and typing in 520 cytologically abnormal women (322 LSIL, 198 HSIL), in 25 squamous and 18 adeno invasive cancers.

HPV testing was performed by polymerase chain reaction (PCR) using L1 consensus primers; HPV typing was performed using specific primers for low and high risk types.

The prevalence of high risk HPV was: LSIL 41%; HSIL 74%; squamous invasive cancers 96% and adeno 100%.

HPV 16 is the most represented type in all lesions.

We also evaluated the usefulness of p53 typing in the early identification of women at risk for cervical cancer.

## INTRODUZIONE

I *Papillomavirus* sono piccoli virus privi di envelope, a simmetria icosaedrica, con DNA bicatenario di circa 8000 pb, avvolto da un capsido di natura proteica (figure I e II).

La struttura genomica è piuttosto complessa (figura III) ed è costituita da geni precoci (Early: E, coinvolti nei processi di replicazione del DNA virale, di mantenimento dello stato episomiale, di regolazione della trascrizione, di maturazione della particella virale, di controllo del numero di copie di DNA episomiale e di trasformazione e immortalizzazione cellulare) e da geni tardivi (Late: L che codificano per le proteine strutturali). La conoscenza dell'organizzazione del genoma è fondamentale per l'iter diagnostico di laboratorio e per la corretta interpretazione dei risultati.

Oggi noi conosciamo circa 100 tipi di papillomavirus che infettano l'uomo (HPV) ed 1/5 di essi è associato a svariate patologie del tratto genitale.

HPV è trasmesso quasi esclusivamente (è rara la trasmissione per fomite) per via sessuale ed è spiccatamente epiteliotropo. Quando infetta le cellule dell'epitelio basale, a seconda dell'immunocompetenza del soggetto, sono possibili evoluzioni diverse: una silente in cui il virus si trova in forma episomiale all'interno della cellula, una proliferativa con produzione di forme vegetative (condilomi) ed infine l'integrazione del genoma con induzione di lesioni spesso di grado elevato. Le manifestazioni cliniche e citologiche (Squamous Intraepithelial Lesion: SIL) HPV asso-

ciate in soggetti immunocompetenti sono mantenute sotto controllo dalla produzione di linfociti T citotossici in grado di riconoscere e distruggere le cellule infette.

Le lesioni di basso grado evolvono verso lesioni di grado elevato solo in una piccola percentuale di casi; soprattutto nelle lesioni di basso grado sono molto frequenti i fenomeni di regressione spontanea.

Nella popolazione femminile sessualmente attiva la localizzazione più frequente a livello della cervice dell'utero è nella zona di transizione dove l'epitelio è più fragile, mentre sulla vulva le localizzazioni più frequenti sono la faccia interna delle piccole labbra ed il vestibolo, che sono le zone più esposte durante il rapporto sessuale. Il DNA di HPV -mediante PCR- è rilevabile, con significativa frequenza, nelle lesioni intraepiteliali di basso grado (Low grade Squamous Intraepithelial Lesion: LSIL) e con frequenza maggiore nelle lesioni intraepiteliali di alto grado (High grade Squamous Intraepithelial Lesion: HSIL). La presenza dell'HPV-DNA è una costante nei carcinomi spinocellulari e negli adenocarcinomi (3, 9).

La diversa capacità oncogena consente di suddividere convenzionalmente gli HPV in tre gruppi:

- 1 - a basso rischio (Low Risk- LR) di trasformazione cellulare: virotipi 6, 11, 26, 32, 42, 61;
- 2 - a rischio intermedio: virotipi 39, 41, 52, 56;
- 3 - ad alto rischio (High Risk- HR): virotipi 16, 18, 31, 33.

In realtà nessun virotipo è di per sé in grado di provocare lesioni precancerose o cancerose per la cui formazione sono necessari ulteriori eventi di natura fisico-chimica, immunologica e forse anche genetica.

A sviluppare, o viceversa a prevenire l'insorgenza di un tumore concorrono due tipi di geni (12): gli oncogeni rappresentati dalle proteine E6 ed E7 di HPV e gli oncosoppressori cellulari (tumor-suppressor genes) rappresentati da due proteine: la pRB e la p53.

L'oncoproteina E6 di HPV è capace, in determinate circostanze, di degradare, attraverso un pathway che coinvolge la proteina ubiquitina, la p53 (nota come "guardiano del genoma") cellulare impedendole di prevenire la replicazione di cellule con danni cromosomici. L'oncoproteina E7 di HPV interagisce con l'oncosoppressore pRB (retinoblastoma) e, degradandolo, determina un segnale proliferativo che impedisce l'uscita delle cellule infette dal ciclo replicativo.

Gli studi sulla proteina p53 hanno inoltre consentito di identificarne un polimorfismo risultante in uno scambio aminoacidico tra prolina ed arginina. La degradazione da parte di E6 di HPV 16 e 18 (virotipi H.R.) è più efficiente (2, 18, 19) quando trova la p53 in omozigosi Arginina/Arginina rispetto all' omozigosi Prolina/Prolina e rispetto allo stadio di eterozigosi Arginina/Prolina.

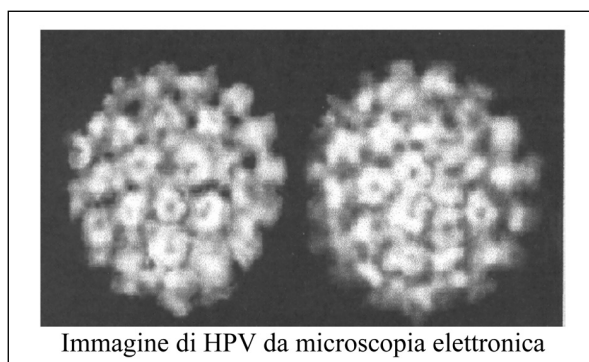


Immagine di HPV da microscopia elettronica

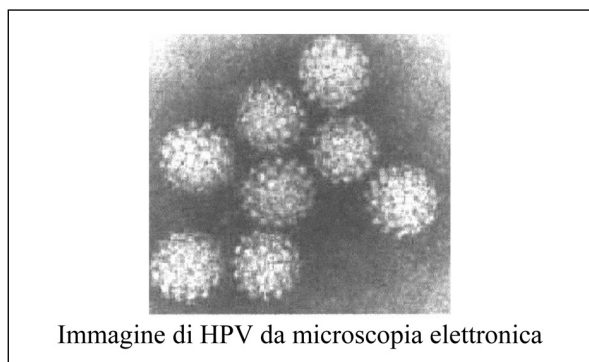


Immagine di HPV da microscopia elettronica

Gene	Funzioni
E1	Replicazione del DNA e mantenimento stato episomiale
E2	Regolazione della trascrizione e replicazione del DNA
E4	Maturazione della particella virale
E5	Controllo del numero di copie del DNA episomiale
E6	Proteina trasformante che lega la p53 e la degrada
E7	Proteina trasformante che lega la pRB e la degrada
E8	Replicazione del DNA
L1	Codifica per la proteina maggiore del capside
L2	Codifica per la proteina minore del capside

Figura III

**MATERIALI E METODI**

Nel periodo 2001-2003 abbiamo effettuato uno studio di ricerca, mediante PCR, del DNA di HPV in un significativo campione di donne, tutte sieronegative per HIV1|2, provenienti dalle province di Catanzaro e Vibo Valentia.

Abbiamo predisposto un modulo, compilato dal ginecologo, che riportava le generalità delle pazienti, l'età, i dati anamnestici fisiologici circa l'epoca del menarca, la parità, l'uso di contraccettivi orali o meccanici ed il consumo di sigarette. Le notizie anamnestiche patologiche riguardavano eventuali biopsie, conizzazioni, isterectomie, annessiectomie, cicli di radioterapia, di chemioterapia, somministrazioni di ormoni, interventi di diatermocoagulazione o di laserterapia.

I dati clinici richiesti consistevano principalmente nello stabilire la presenza o meno di sintomi quali: prurito, leucorrea, xantorrea, sanguinamento, dispareunia, bruciore ed algie pelviche.

Nel modulo dovevano essere riportati gli esiti di precedenti esami cito-istologici e colposcopici.

I campioni pervenuti erano stati raccolti mediante la tecnica del brushing cervicale ed il cyto brush era stato vigorosamente agitato in un apposito flacone sterile contenente un liquido di mantenimento capace di preservare il DNA dalla presenza di muco e sangue.

Abbiamo effettuato la ricerca dell'HPV DNA in 322 casi di LSIL (età media 32 anni); in 198 casi di HSIL (età media 48 anni); in 25 casi di carcinomi squamosi (età media 46 anni) e in 18 casi di adenocarcinomi (età media 51 anni).

L'iter diagnostico è iniziato con un test PCR di screening, per una generica valutazione della presenza dell'HPV mediante l'esecuzione di un primo ciclo di amplificazione del DNA per la regione genomica L1, comune alla maggior parte di ceppi virali.

Il kit adoperato è prodotto dalla ditta Amplimedical (ex Bioline) ed è fornito di un controllo positivo, di uno negativo e dei controlli di estrazione dell'acido nucleico e di amplificazione. La fase di rivelazione avviene in gel di agarosio al 2-4%. I primers utilizzati sono l'MY09

sense e l'MY11 antisense. Il prodotto di reazione ha le dimensioni di circa 450 bp, la sensibilità della reazione permette di rilevare almeno 50 genomi virali.

I campioni positivi per la regione L1 sono stati sottoposti ad un ulteriore ciclo di amplificazione per valutare la presenza di ceppi di HPV a basso rischio (Low Risk o L.R.) o ad alto rischio (High Risk o H.R.). Il kit adoperato è prodotto dall'Amplimedical e prevede l'impiego di primers leganti sequenze nucleotidiche specifiche delle regioni E6 ed E7 del genoma di ceppi a basso rischio (primers pU-31B sense e pU-2R antisense) e ad alto rischio (primers pU-1M sense e pU-2R antisense). La fase di rilevazione avviene in gel di agarosio e il prodotto di reazione di HPV L.R. ha le dimensioni di 228 bp, mentre quello di HPV H.R. ha le dimensioni di 233-268 bp.

I campioni positivi per HPV a basso rischio, da tutti riconosciuti oncologicamente irrilevanti, non sono stati ulteriormente tipizzati.

I campioni positivi per alto rischio sono stati invece sottoposti ad un ulteriore ciclo di amplificazione al fine di tipizzare l'HPV mediante l'impiego di primers specifici per sequenze oligonucleotidiche caratteristiche di ciascun ceppo H.R. (Kit Amplimedical ceppi 16,18,31,33 e 35). La fase di rivelazione consiste in una reazione di ibridazione in micropiastra: il DNA prodotto dalla reazione viene denaturato e fatto adsorbire ai pozzetti; a ciascun pozzetto è aggiunta una delle sonde biotilate specifiche per i genotipi HPV ed un saggio colorimetrico con il coniugato streptavidina-perossidasi rivela l'ibridazione delle sonde. La micropiastra viene letta allo spettrofotometro e nei campioni in cui il valore della densità ottica supera il cut off, si ha la presenza del genotipo HPV corrispondente alla sonda impiegata.

I dati di letteratura riportano la minore sensibilità della PCR nelle lesioni di alto grado e neoplastiche rispetto ai valori riscontrabili per lesioni di basso grado. Infatti la progressione di una lesione intraepiteliale verso il carcinoma infiltrante comporta una progressiva integrazione di parte del genoma virale nel DNA della cellula ospite con perdita di alcuni geni tra cui la regione L1 (4).

Abbiamo pertanto effettuato in 30 campioni di donne con HSIL, risultate HPV negative al test di screening, il test di tipizzazione E6 ed E7, ma in verità il risultato ha confermato l'assenza dell'HPV-DNA.

Il polimorfismo dell'oncosoppressore cellulare p53 è stato studiato in 146 delle pazienti risultate positive per HPV 16 e 18. Il kit adoperato è della ditta Alphagenics Diaco Biotechnologies. Esso non prevede alcun sistema di estrazione poiché

utilizza il DNA estratto per la PCR. Si amplifica la regione fiancheggiante il sito di polimorfismo localizzato nel residuo 72 ed in micropiastra si sottopone ad ibridazione l'amplificato digossigenato in due pozzetti, uno dei quali contiene la sonda relativa all'allele p53Arg e l'altro quella relativa all'allele p53Pro. Si aggiunge il coniugato anti-digossina -POD e, dopo lavaggio, il substrato; la densità ottica dei pozzetti consente l'identificazione del genotipo.

Nello studio del polimorfismo della proteina p53 il gruppo di controllo è costituito da 146 donne risultate negative alla ricerca dell'HPV.

## RISULTATI

Nelle 322 pazienti con diagnosi di LSIL abbiamo riscontrato in 133 (41%) l'HPV H.R., in 106 (33%) l'HPV L.R. ed in 83 (26%) l'HPV non è stato rilevato (tabella 1).

Nelle 198 pazienti con diagnosi di HSIL (tabella 2) abbiamo riscontrato in 146 (74%) l'HPV H.R., solo in 28 (14%) l'HPV L.R. ed in 24 (12%) non è stato rilevato l'HPV né con il test di screening, né con il test di tipizzazione delle oncoproteine del virus (E6 - E7).

Interessante il rilievo della presenza dell'HPV H.R. in 4 pazienti precedentemente sottoposte a conizzazione, in 15 con anamnesi recente di diatermocoagulazione e/o laserterapia.

Nei 25 carcinomi squamosi e nei 18 adenocarcinomi la presenza di HPV H.R. è rispettivamente del 96 e del 100% (tabelle 3 e 4).

In una paziente con carcinoma squamoso non è stato rilevato il DNA di HPV, né con il test di screening né con il test di tipizzazione E6 - E7.

Nei carcinomi squamosi il virotipo H.R. 16 è il più frequente (19 su 24: 79%), a differenza degli adenocarcinomi in cui è prevalsa la presenza del virotipo H.R. 18 (13 su 18: 72%).

In 321 delle pazienti risultate positive per HPV H.R. abbiamo ricercato il virotipo (tabella 5). Tale ricerca ha evidenziato la netta prevalenza del virotipo 16 (132 su 321: 41%), seguito dal virotipo 18 (79 su 321: 24,5%) e dal 31 (46 su 321: 14,5%).

La presenza del virotipo 33 è molto contenuta (16 su 321: 5%) così come è risultata limitata la contemporanea presenza dei virotipi 16 e 18 (16 su 321: 5%).

In altre 16 pazienti (5%) è stata verificata la contemporanea presenza dei virotipi 16, 31 e 33; marginale la contemporanea presenza in 8 pazienti (2,5%) dei virotipi 18,31 e 33, pari a quella dei virotipi 31 e 33 in altre 8 pazienti.

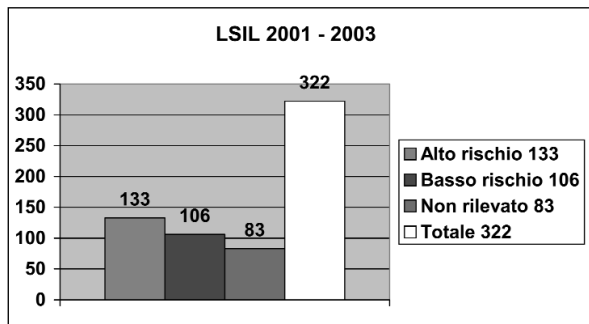
Assente il virotipo 35.

In 146 pazienti positive H.R. (111 per HPV 16 e 35 per HPV 18) abbiamo genotipizzato l'onco-

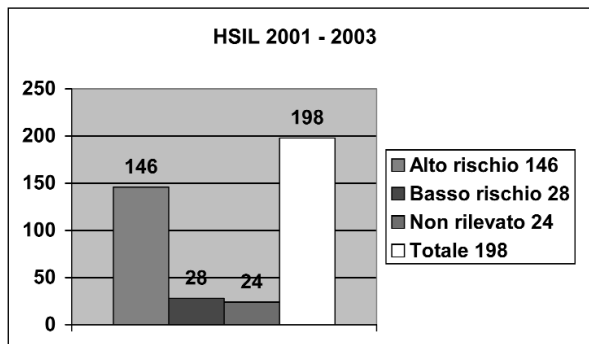
soppressore cellulare p53 con un test genomico che utilizza qualunque campione biologico. Il gruppo di controllo per tale studio è costituito dai campioni di 146 donne con Pap-test normale, in cui abbiamo escluso la presenza dell'HPV DNA.

I dati ottenuti (tabella 6) hanno evidenziato nei 2 gruppi rispettivamente il 19 ed il 18% di genotipo p53Arg/p53 Arg.

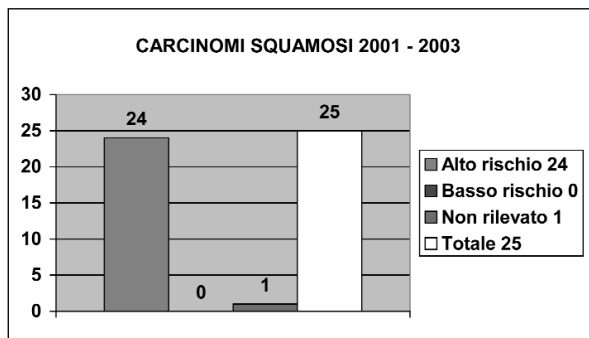
**Tabella 1**



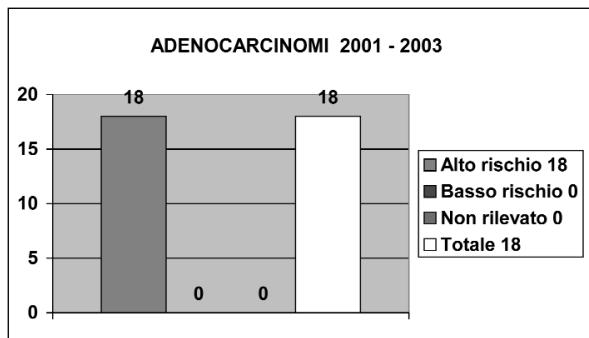
**Tabella 2**



**Tabella 3**



**Tabella 4**



**Tabella 5. Tipizzazione HPV-DNA alto rischio 2001 - 2003**

Pazienti (321)	Virotipo
132	16 (41%)
79	18 (24,5%)
46	31 (14,5%)
16	33 (5%)
16	16 + 18 (5%)
16	16 + 31 + 33 (5%)
8	18 + 31 + 33 (2,5%)
8	31 + 33 (2,5%)

**Tabella 6. Genotipizzazione p53 in 146 pazienti con HPV-DNA alto rischio**

Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro
28 (19%)	41 (28%)	77 (53%)
Genotipizzazione p53 in 146 pazienti con HPV-DNA non rilevato		
Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro
26 (18%)	44 (30%)	76 (52%)

**DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

La determinazione biomolecolare del virus e la sua tipizzazione hanno senza dubbio un impatto fondamentale nella prevenzione del carcinoma della cervice (5, 6, 11, 15, 16).

Essa infatti consente, se effettuata contemporaneamente al Pap test, di allungare il tempo di intervallo dello screening (10, 13); di selezionare i soggetti da inviare al secondo livello dopo Pap test dubbio o di basso grado (1), di ottimizzare il follow-up delle lesioni intraepiteliali per predirne la regressione, persistenza o progressione ed infine di monitorare le pazienti trattate per patologia cervicale.

L'associazione dei test morfologici con la ricerca dell'HPV DNA rappresenta un moderno metodo di approccio allo studio della patologia cervicale (14). È noto infatti che il Pap test può raggiungere una sensibilità massima dell'80%: cioè sottostima nel 20% dei casi lesioni -specie se topograficamente limitate- anche di medio ed alto grado, classificandole come LSIL. Invece il test molecolare ha una sensibilità compresa tra il 95 e il 98% e la combinazione Pap test/HPV DNA raggiunge valori vicini al 100%.

Tuttavia l'applicazione di un test di ricerca del DNA dell'HPV in un programma di screening, benchè già proposto, rimane attualmente di difficile attuazione per problemi di costi. È più diffuso invece l'uso del test in donne con Pap test anormale anche se ormai sono molti i ginecologi, specie quelli americani, che consigliano la ricerca dell'HPV H.R. come screening e, in caso di positività del DNA virale, l'effettuazione del Pap test. L'alto valore predittivo negativo dell'HPV DNA test è in grado di escludere la presenza di lesioni di

grado superiore e pertanto offre alla paziente che risulta negativa il conforto psicologico necessario per affrontare più tranquillamente il follow-up.

Numerosi studi evidenziano che non è solo la persistenza di HPV ad alto rischio oncogeno a favorire lo sviluppo di lesioni pre-invasive o invasive ma è anche, se non soprattutto, la carica virale elevata e protratta nel tempo (17).

Ricercatori svedesi (8) hanno valutato la carica virale con una PCR quantitativa in 478 strisci di Pap test ottenuti da pazienti che hanno poi sviluppato un carcinoma in situ; gli strisci erano stati raccolti 7-8 anni prima della diagnosi di cancro. I loro dati dimostrano che il rischio di cancro aumenta in caso di carica virale stabilmente elevata.

Il valore predittivo della presenza di HPV H.R. aumenterà quindi quando avremo a disposizione (7) un test validato per la quantificazione del DNA virale.

Per quanto riguarda infine l'utilità del test di genotipizzazione p53, i nostri dati non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra le donne positive HPV H.R. ed il gruppo di controllo.

La casistica è forse ancora limitata: sono necessarie ulteriori indagini per chiarire se lo studio della predisposizione genetica legata all'allele p53 Arg, oltre ad avere una funzione diagnostica, potrà avere quella preventiva, suggerendo in caso di omozigosi p53 Arg/p53 Arg l'intensificazione dei controlli ginecologici e la predisposizione di eventuali interventi terapeutici.

## BIBLIOGRAFIA

- Albano G, Bova E, Calipari I, et al. LSIL e HPV: studio morfologico e molecolare mediante PCR di 154 casi. XVI Congresso Nazionale Società Italiana Colposcopia e Patologia Cervico Vaginale 2001; Reggio Calabria 8-10 Novembre.
- Albano G, Bova E, De Grazia R, et al. Papillomavirus ad alto rischio oncogeno nelle LSIL e genotipizzazione p53. European Society Infectious Diseases in Obstetrics and Gynaecology 2001; Trieste 5-7 Dicembre.
- Burk RD. Papillomavirus umano e rischio di carcinoma cervicale. *Minuti* 2000; 3: 23-27.
- Chen CM, Shyu MP, Chu HW, et al. Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *Journal medical Virology* 1994; 44 (2): 206-11.
- Cox JT, Schiffmann MH, Winzelberg AJ, et al. An avaluation of human papillomavirus testing as part of referral to colposcopy clinics. *Obstetric Gynecology* 1992; 80: 389-95.
- Cuzick J, Sasieni P, Davies P, et al. A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technology Assessment* 1999; 3: 1-204.
- Hart KW, Williams OM, Fiander AN, et al. Novel method for detection, typing and quantification of human papillomaviruses in clinical samples. *Journal Clinical Microbiology* 2001; 39: 3204-12.
- Joseffson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, et al. Viral load of human papillomavirus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000; 355: 2189-93.
- Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation of papillomavirus infection. *New England Journal Medicine* 1992; 327: 1272-78.
- Manos MM, Kinney WK, Hurley LB, et al. Identifying women with cervical neoplasia using human papillomavirus DNA testing for equivocal papanicolau results. *JAMA* 1999; 281: 1605-10.
- Meijer CJ, Van Der Brule AJ, Snijders PJ et al. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology. Possible implications for cervical cancer screening. In Munoz N, Bosch FX, Shah KV. The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. *IARC Sci Publ* 1992; 119: 271-81.
- Phillips AL, Voudsen KH. Human papillomavirus and cancer: the viral transforming genes. *Cancer Surveys* 1999; 33:1-20.
- Reid R, Greenberg MD, Lorincz A, et al. Should cervical cytologic testing be augmented by cervicography or human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection? *American Journal Gynecology* 1991; 164: 1461-71.
- Ronco G, Voglino G, Volante R, et al. HPV testing in cytologically abnormal women in Italy. 18<sup>th</sup> International Papillomavirus Conference 2000; 21-28 July Barcelona, Spain.
- Schiffman MH, Herrero R, Hildesheim A. HPV DNA testing in cervical cancer screening. *Journal American Medicine Association* 2000; 283: 87-93.
- Schneider A, Zham DM, Kirchmayr R, et al. Screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3. Validity of citologic study, cervicography and human papillomavirus detection. *American Journal Gynecology* 1996; 174: 1534-41.
- Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *Journal Clinical Microbiology* 1999; 37: 1030-34.
- Van Duin M. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *Journal General Virology* 2000; 81: 317-25.
- Zehbe I, Voglino G. Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. *Lancet* 1999; 354: 218-19.

### Rosanna Masciari

Via Luigi Pascali n° 30, 88100 Catanzaro -  
tel. 0961725069 - fax 0961883490 -  
E-mail: [ros49@libero.it](mailto:ros49@libero.it)

# Valutazione del rischio di trasmissione del parvovirus B 19 attraverso la trasfusione di sangue ed emocomponenti: risultati preliminari

**Vera Mininni, Luigi Bencivenga, Pietro Bevilacqua, Massimo Clery, Giancarlo Iannaccone, Edoardo Masini, Claudio Marra (1), Edgardo Meluccio, Emilio Tremiterra, Bruno Zuccarelli.**

*Ospedale Monaldi - Napoli - Azienda Ospedaliera di Rilevanza Nazionale e di alta Specializzazione  
Via Leonardo Bianchi 80131 - Napoli  
Centro medicina trasfusionale  
(1)Cattedra di cardio-chirurgia*

**Evaluation of risk of Parvovirus B19 transmission by blood and hemocomponents transfusion : preliminary results.**

**Key words:** pv B19 infection, pv B19 antigen determination, patients at risk.

## SUMMARY

Transmission of parvovirus B19 by blood and hemocomponents transfusion is nowadays well demonstrated. Even if pv B19 infection is responsible for relevant clinical symptoms in some groups of patients, the screening on the donors is not mandatory.

This study is aimed to provide a contribution of knowledge on the actual prevalence of infection within our donors population, using as an indirect index the determination of pv B19 Ag on selected patients who received blood or hemocomponent transfusions at our Hospital.

## INTRODUZIONE

Nell'ambito del programma di emovigilanza messo in atto dal SIT dell'Azienda Ospedaliera "V. Monaldi" di Napoli, pubblichiamo i risultati preliminari dello studio effettuato per valutare la frequenza di positività per il parvovirus B19 sulla popolazione dei nostri donatori nel periodo dal Giugno 2001 al Giugno 2003. L'indice di positività è stato determinato in maniera indiretta sottoponendo allo screening sierologico per il pv B19 una popolazione selezionata di pazienti ricoverati presso il reparto di Cardiochirurgia, che hanno ricevuto trasfusioni di sangue o di emocomponenti.

Il crescente interesse in campo trasfusionale per la diagnosi dell'infezione da pv B19 è giustificato da diversi fattori:

- innanzitutto la documentata possibilità di trasmissione del virus attraverso il sangue, plasma ed emocomponenti
- la sua resistenza all'inattivazione da parte di agenti chimico fisici
- la gravità dei quadri clinici indotti dalla trasmissione del virus in alcune categorie di pazienti a rischio (donne in gravidanza, talassemici, emofilici, trapiantati). (1)

Il parvovirus B19 fu scoperto in Inghilterra nel 1975 durante lo screening di donatori di sangue per antigeni di superficie per l'epatite B. "B19" si riferisce al campione in cui fu isolato per la prima volta.

È l'agente causale della "quinta malattia" o megaloeritema infettivo, è un virus a DNA a singola elica non capsulato. Recentemente, con l'evolversi delle metodologie diagnostiche, è stato possibile definire ed ampliare lo spettro delle manifestazioni cliniche in cui è implicato il virus.

Infatti anche se l'eritema infettivo è la patologia più frequente, al virus sono correlate anche artropatie post infettive, crisi aplastiche in soggetti con anemie emolitiche (2) o in corso di immunodeficienze primarie e secondarie e recentemente è stata evidenziata l'associazione tra parvovirus B19 e vasculiti del tipo panarterite nodosa, malattia di Kawasaki, nonché con la porpora trombocitopenica idiopatica (4). Da ciò deriva un rischio trasfusionale da non sottovalutare, specie se riferito a determinate categorie di pazienti (trapiantati, immunodepressi, neonati).

## MATERIALI E METODI

Sono stati studiati 160 pazienti di età compresa tra

40 e 70 anni, tutti ricoverati presso il reparto di Cardiocirurgia per essere sottoposti a vari tipi di interventi.

I pazienti selezionati sono risultati negativi al prelievo basale (prima dell'intervento chirurgico) alla ricerca dell'HBsAg, degli anticorpi per HIV1/2, degli anticorpi per HCV, al TPHA ed alla determinazione dell'antigene del parvovirus umano B19.

Un'aliquota di ciascun campione di siero è stata congelata a  $-80^{\circ}\text{C}$  in quanto, per i campioni positivi, è stata prevista la ripetizione dei test in duplicato. La determinazione dell'HBsAg, degli anti-HCV e degli anti-HIV1/2 è stata eseguita con metodica immunoenzimatica. Il TPHA è stato eseguito con test in agglutinazione passiva per la determinazione degli anticorpi anti *Treponema Pallidum*.

La determinazione dell'antigene PV B19 è stata eseguita utilizzando l'ID Parvovirus B19 Antigen test DIAMED (test di emoagglutinazione recettore mediata su supporto di gel di sephadex).

Il test utilizza speciali ID CARD provviste di sei microtubi, contenenti una matrice di gel di sephadex tamponata.

Le emazie sono sospese in una soluzione tampone che amplifica le proprietà del pv B19 di agglutinare le emazie stesse.

La procedura prevede innanzitutto la preparazione delle emazie; esse vengono centrifugate 3 minuti a 2000 rpm. Il surnatante, che deve apparire perfettamente limpido, viene eliminato dopo averne misurato il volume e sostituito con pari volume di ID buffer.

Le cellule così pronte all'uso possono essere utilizzate per 8 ore.

Quindi 10  $\mu\text{l}$  di plasma del campione in esame vengono messi a contatto, nelle microprovette delle ID-cards, con 25  $\mu\text{l}$  di emazie test (emazie O negative, positive per l'antigene P, recettore cellulare per il virus). In presenza di pv B19, le emazie sono agglutinate e tale reazione viene evidenziata dopo centrifugazione con score di positività variabile da + a + + + +.

Gli stessi pazienti testati e risultati negativi al prelievo basale sono stati ritestati, dopo aver ricevuto trasfusione di sangue o di emocomponenti in seguito all'intervento, a distanza di 3 mesi, di 6 mesi e di 1 anno dall'avvenuta trasfusione.

### RISULTATI PRELIMINARI

Sono risultati positivi al prelievo basale per la ricerca dell'antigene del pv B19 il 4% dei sieri

testati, che sono ovviamente stati esclusi dallo studio in oggetto. Dei rimanenti 160 pazienti sono risultati positivi alla determinazione dell'antigene pv B19 post trasfusione (ovvero al primo controllo effettuato dopo 3 mesi dall'avvenuta trasfusione) 6 pazienti, con uno score di positività di + + + per quattro di loro e di + + per gli altri due.

Questi risultati sono stati confermati al controllo effettuato a sei mesi ed a 1 anno dall'intervento.

In conclusione, lo scopo di eseguire eventualmente questo test, come screening aggiuntivo, è quello di non utilizzare gli emocomponenti provenienti da donatori con viremia in atto per il pv B19, anche in considerazione del fatto che la determinazione delle IgM specifiche non è una strategia efficace per ridurre la trasmissione; infatti, spesso, nei casi in cui il livello della viremia è notevolmente elevato non risultano determinabili (3).

### CONCLUSIONI

La presente indagine, seppur preliminare, suggerisce quindi l'utilità di un eventuale uso routinario del test diagnostico almeno sulle unità destinate alle categorie a rischio, anche se in considerazione del fatto che l'infezione da pv B19 sembra essere coinvolta in patologie la cui etiologia non è ancora ben nota (come il LES) (5), si potrebbe ipotizzare di eseguire la ricerca del parvovirus B19 DNA in PCR su tutti i donatori (6).

**BIBLIOGRAFIA**

1. Wakamatsu C, Takakura F, Kojima E, et al. : Screening of blood donors for human parvovirus B19 and characterization of the results. *Vox Sang*, 76, 14, 1999.
2. Bergen GA, Sakalosky PE, Sinnot JT, et al. Transient aplastic anemia caused by parvovirus B19 infection in a heart transplant recipient. *J Heart Lung Transplant*, 15, 843, 1996.
3. Jordan J, Tiangco B, Kiss J, et al. Human parvovirus B19 : prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipient. *Vox Sang*, 75, 97, 1998.
4. Finkel TH, Torok JS, Ferguson, et al. Chronic parvovirus B19 infection and systemic necrotizing vasculitis : opportunistic infection or aetiologic agent ? *Lancet*, 343, 1255, 1994.
5. Neshor G, Osborne TG, Moore TL, et al. Parvovirus infection mimicking systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*, 24, 297, 1995.
6. Hirzler WE et Runkel S : Prevalence of human parvovirus B19 in blood donors as determined by a haemagglutination assay and verified by polymerase chain reaction . *Vox Sang*, 82, 18, 2002.

*Si ringraziano per la collaborazione i Sig.ri: A. Pazzano, S. Leone, G. Rosolino, F. Velvi, U. Antonaci, G. Bonelli.*

**Vera Mininni**

Ospedale Monaldi Napoli  
Centro di Medicina Trasmfusionale  
Tel.081-7064098 Fax 081-7062606  
L'indirizzo e-mail è:  
**vera.mininni@ospedalemonaldi.it**