

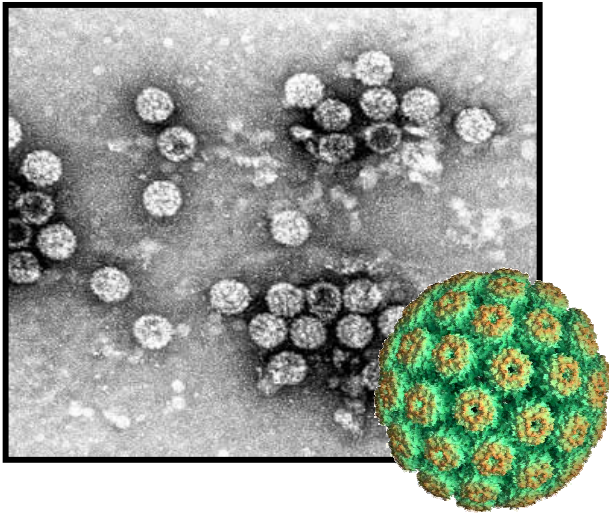


L'infezione da HPV

Università degli Studi di Bologna/Ospedale Policlinico S.Orsola
Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale
Sezione di Microbiologia

Dott.ssa Simona Venturoli

PAPILLOMAVIRUS UMANI (HPV)



Famiglia: *Papillomaviridae*

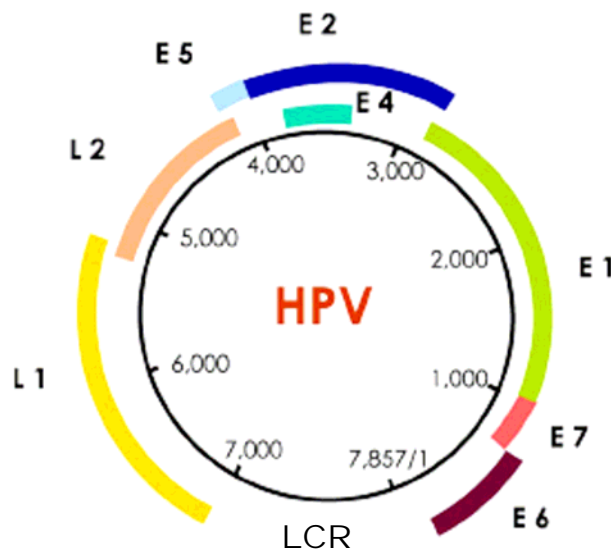
Genere: **Papillomavirus**

Genoma: dsDNA, circolare,
8.000 bp

Capside: icosaedrico, 52-55
nm, 72 capsomeri

Specie-specifici ed epiteliotropi

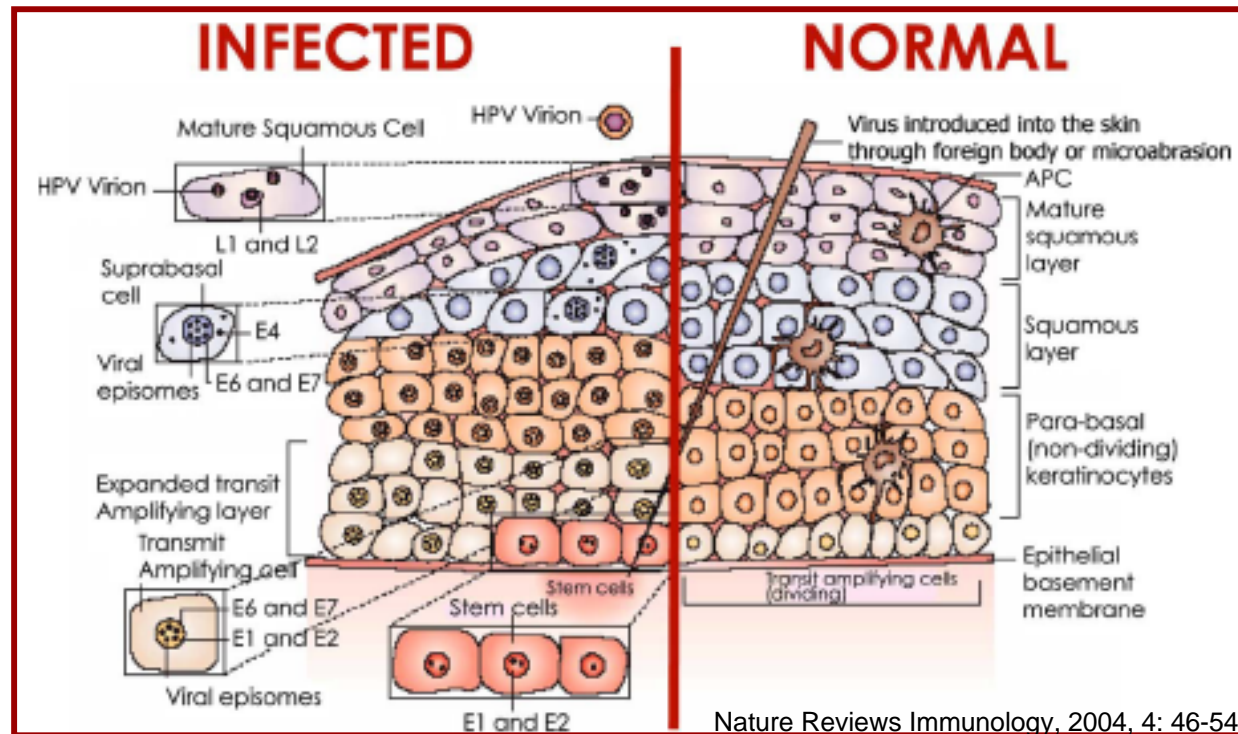
Agenti eziologici di lesioni
cutanee e mucose (HPV
mucosali e cutanei)



Organizzazione del genoma:

- LCR (regolatoria, non codifica)
- Early region (E1, E2, E4, E5, E6, E7, E8)
- Late region (L1, L2)

PROGRESSIONE NEGLI STRATI EPITELIALI DELL'INFEZIONE DA HPV



Inibizione trascrizione di E6/E7

Particelle virali complete



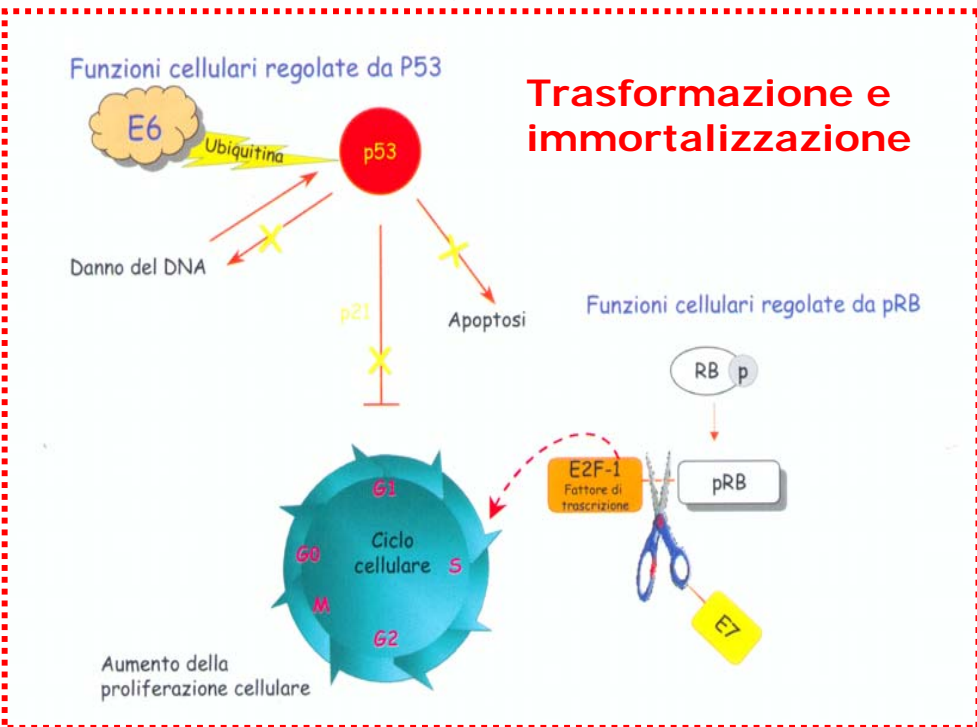
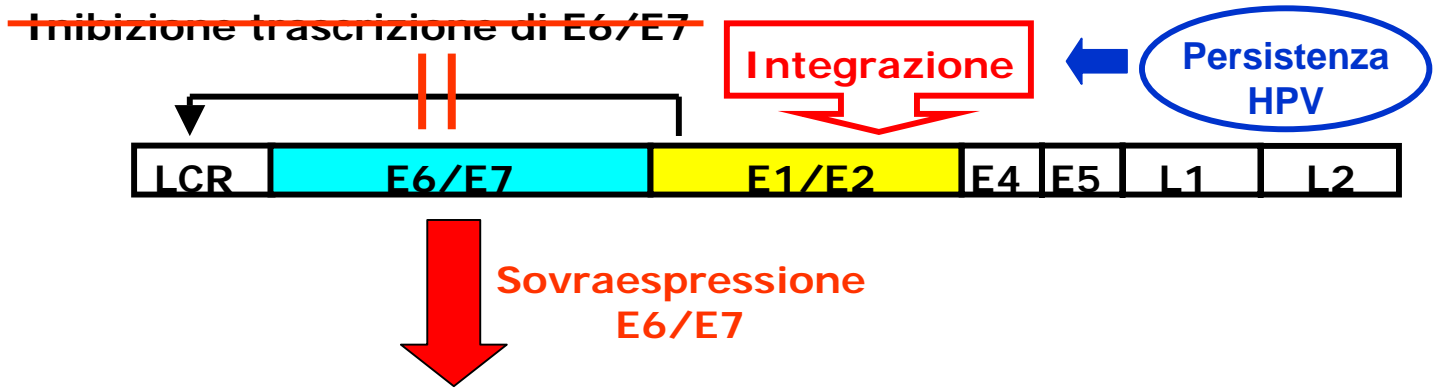
Fattori cellulari

Differenziamento cellulare

Replicazione DNA

INFEZIONE

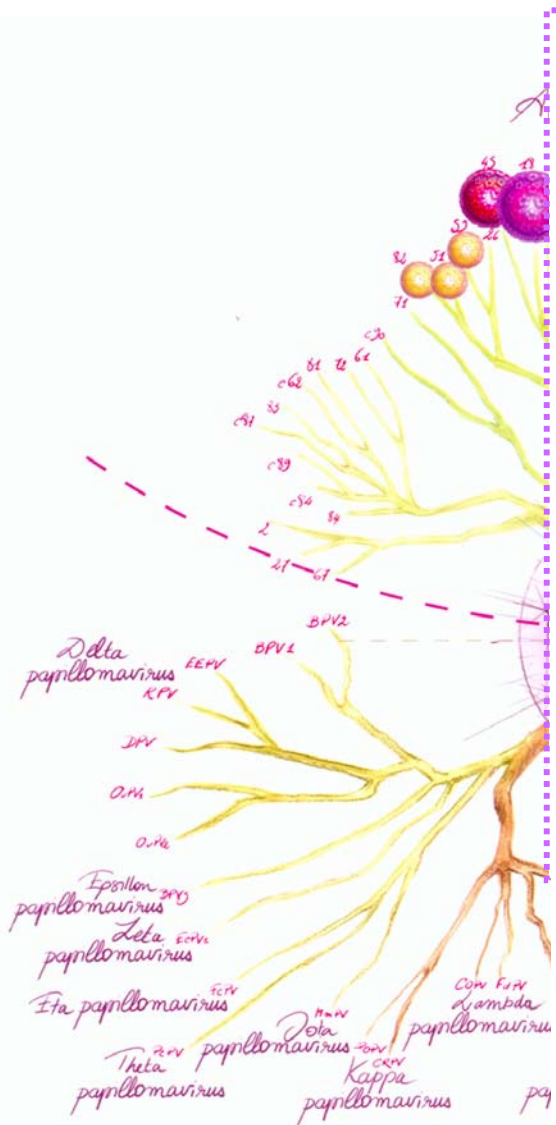
INFEZIONE DA HPV e TRASFORMAZIONE



E6-p53 → degradazione p53

E7-pRB → sottrae pRB all legame con fattori trascrizionali E2F-1

CLASSIFICAZIONE FILOGENETICA ED EPIDEMIOLOGICA DEGLI HPV



HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK	HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK	HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK
9	HPV 52	High	10	HPV 6	Low	4	HPV 57	Undetermined
	HPV 67	Undetermined		HPV 11	Low		HPV 2a	Undetermined
	HPV 33	High		HPV 13	Low		HPV 27	Undetermined
	HPV 58	High		HPV 74	Undetermined	15	HPV 71	Undetermined
	HPV 16	High		HPV 44	Low		HPV 90	Undetermined
	HPV 31	High		HPV 55	Undetermined	3	HPV 61	Low
HPV 35	High	8	HPV 91	Undetermined	HPV 72		Low	
11	HPV 34		Undetermined	HPV 7	Undetermined		HPV 62	Undetermined
	HPV 73		Probably high	HPV 40	Low	HPV 81	Low	
	7	HPV 59	High	1	HPV 32	Undetermined	HPV 83	Undetermined
		HPV 18	High		HPV 42	Low	HPV 84	Undetermined
		HPV 45	High	13	HPV 54	Low	HPV 86	Undetermined
HPV 70	Low	2	HPV 28		Undetermined	HPV 3	Undetermined	
HPV 39	High		HPV 10	Undetermined	HPV 29	Undetermined		
HPV 68	Probably high		HPV 77	Undetermined				
HPV 85	Undetermined	6	HPV 26	Probably high	70%	Genus Alpha-papillomavirus		
5	HPV 69		Undetermined	HPV 53			Probably high	
	HPV 51		High	HPV 56			High	
	HPV 82		Probably high	HPV 66			Probably high	

Più di 40 genotipi di HPV mucosali, 15 genotipi ad "alto rischio certo" identificati quale causa del carcinoma della cervice uterina (99,7%), ma anche di carcinomi anali (45-95%), di carcinomi vaginali (60-65%) e di carcinomi della vulva (40-60%).

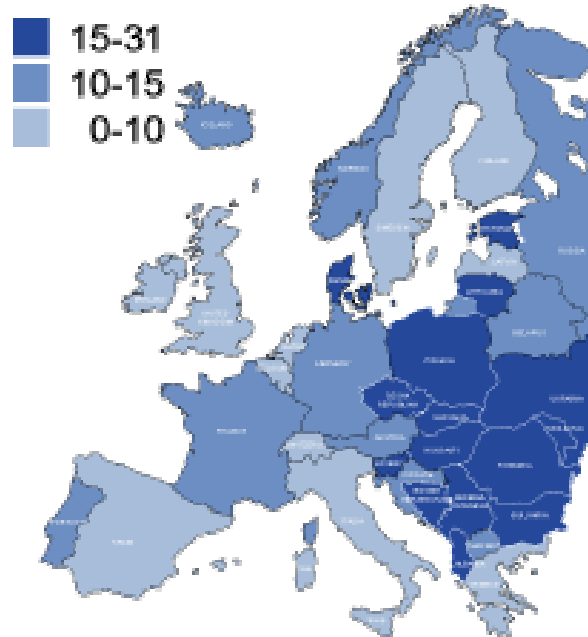
INCIDENZA DEL CARCINOMA DELLA CERVICE NEL MONDO

- Il carcinoma della cervice uterina è la **seconda causa di morte** per tumore tra le donne nel mondo
- **500.000 nuovi casi** di carcinoma della cervice ogni anno nel mondo, **280.000 morti/anno**
- La maggior parte dei casi di carcinoma cervicale si riscontra in **Africa, Centro e Sud America**
- **60.000 nuovi casi** di carcinoma della cervice ogni anno in Europa, **30.000 morti/anno**

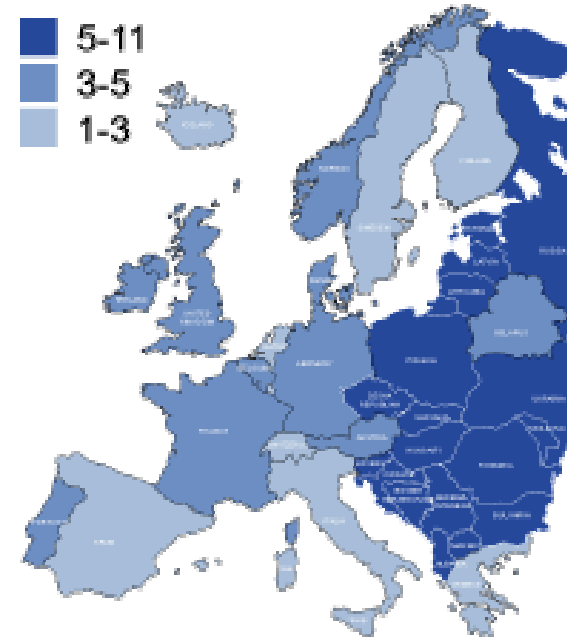


INCIDENZA E MORTALITA' IN EUROPA

Incidenza



Mortalità



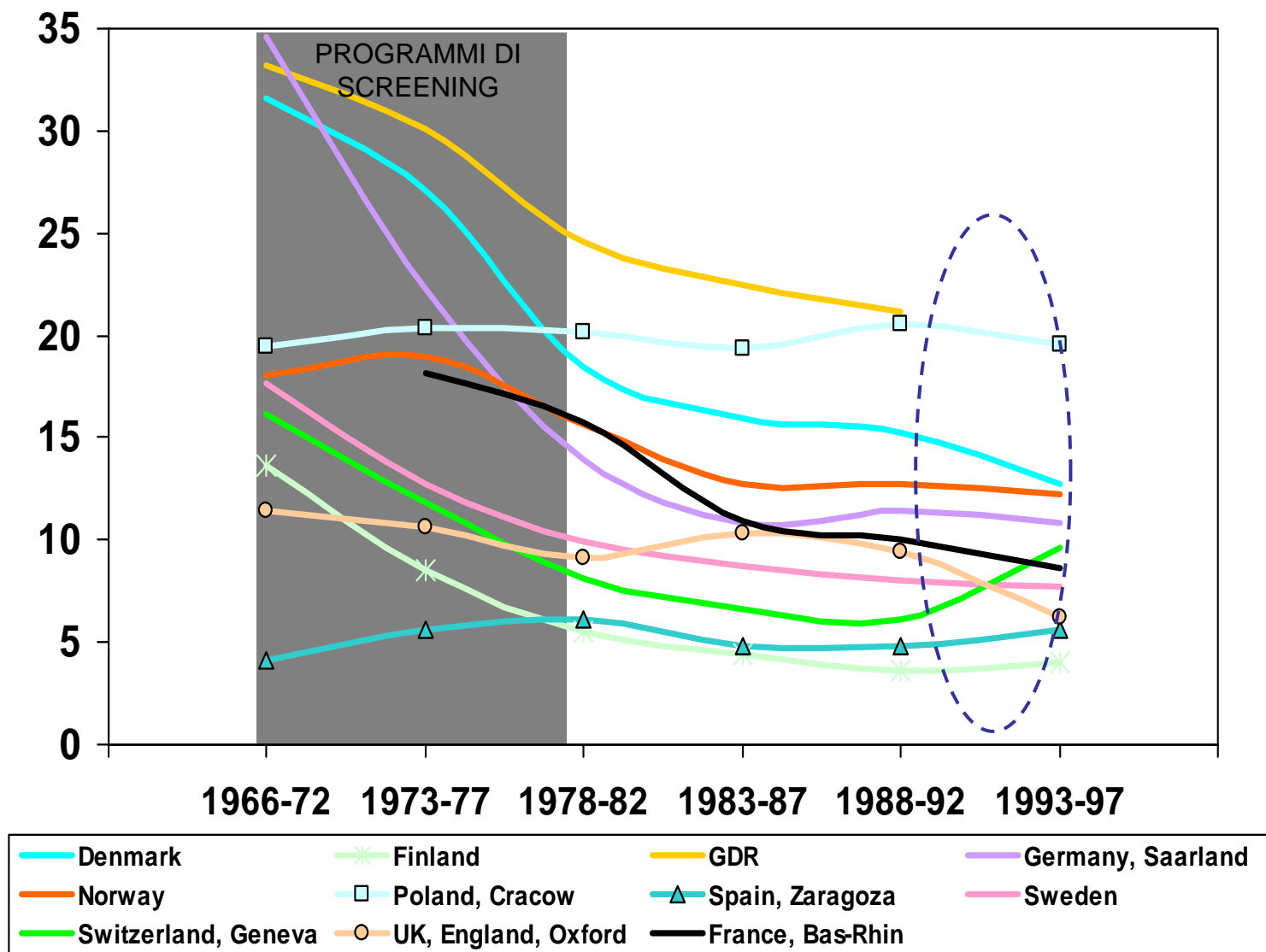
Incidenza (numero di nuovi casi per 100.000) ; Mortalità (numero di decessi per 100.000) - Fonte Globocan 2000

	Italia	Europa occidentale	Europa orientale	Tutta l'Europa
Incidenza	9.05	9.34	17.44	13.48
Mortalità	2.42	3.91	6.81	4.98

Programmi di screening e trattamento degli stadi precoci



INCIDENZA DEL CARCINOMA CERVICALE IN EUROPA



STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE CERVICALE DA HPV

- 80% della popolazione femminile ha anticorpi anti-proteine dell'HPV
- Donne con infezione da HPV a livello cervicale:
 - 80% presenta un'infezione "transitoria" con regressione spontanea dell' infezione (18-24 mesi)
 - 20% presenta un'infezione "persistente" (oltre 2 anni) → **40%** delle infezioni persistenti possono portare allo sviluppo di neoplasie intraepiteliali squamose (CIN)

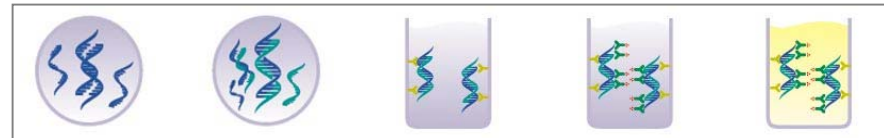


TEST PER LA RICERCA DI HR e LR HPV

➤ La stretta relazione tra **infezioni da HR-HPV persistenti** e lo sviluppo di **CIN e carcinomi della cervice** ha portato allo sviluppo e all'impiego diagnostico di test molecolari per la **ricerca di HPV a alto (e basso) rischio**

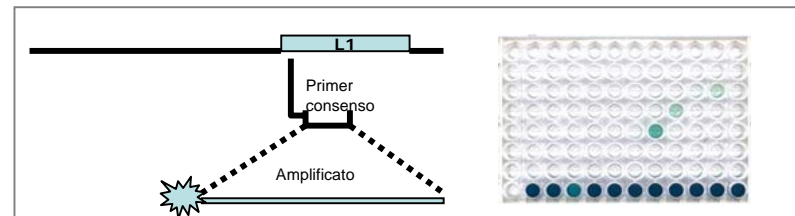
– Test in uso:

• Hybrid Capture II



Ibridazione in fase liquida con pool di sonde a RNA per LR o HR-HPV, cattura su pozzetto e rivelazione chemiluminescente con amplificazione del segnale

• PCR-based Methods



Impiego di primer di consenso o multiplex (MY09-11, PGMY, GP5+/6+, SPF10) che amplificano un ampio spettro di HPV.

I prodotti vengono rivelati impiegando pool di sonde HPV specifiche in saggi immunoenzimatici su piastra [Amplicor HPV]

Ruolo dei test per HR-HPV:

1. **Screening per carcinoma della cervice (>30 aa)**
 - Riduzione dei falsi negativi al Pap test (Pap+HPV test=100% sensibilità) \longrightarrow intervallo di screening aumentato
 - Identificazione degli Adenocarcinimi (AdCa) e dei precursori che spesso non vengono visti al Pap
2. **Triage di ASCUS/BMD**
 - Solo i positivi per HR-HPV vengono controllati a 6 mesi o inviati ai ginecologi \longrightarrow riduzione dei follow up citologici
3. **Follow up post trattamento per CIN2/3 (e AIS)**
 - In combinazione con il Pap ha importante valore predittivo negativo per CIN3 (e per AIS)

Screening per carcinoma della cervice

TRIALS EUROPEO (Meta-Analisi) Sensibilità dei test HPV-DNA and Pap

	Francia	UK	Germania	Total
HPV DNA test	100%	97.7%	97.8%	98.6%
Pap test	68.1 – 87.9%	83.1%	43.5%	71.4%
Entrambi	100%	100%	100%	100%

Specificità: HPV-DNA 92.5%, Pap test 96.2%

Follow up post trattamento per CIN2/3

Post trattamento CIN 2/3	Sensibilità		Specificità	
	HPV#	Pap	HPV #	Pap
3 mesi	93%	58%	86%	91%
6 mesi	90%	62%	92%	91%
12 mesi	90%	72%	96%	95%
24 mesi	93%	93%	99%	96%

90% stesso genotipo

Possono i Test per HPV-DNA attuali sostituire nello screening la citologia?

- Hanno un **NPV** di molto superiore alla citologia (98,5 vs 71,5) , ma non raggiungono il 100%
 - Il test ideale dovrebbe unire la sensibilità analitica della PCR con la capacità di riconoscere tutti gli stati fisici del DNA di HPV
- Hanno un **PPV** **assai scarso**
 - il problema potrebbe essere risolto classificando in categorie di rischio le donne positive per HR-HPV impiegando **diversi markers**:
 - Tipizzazione virale
 - Carica virale
 - Espressione degli mRNA virali E6/E7

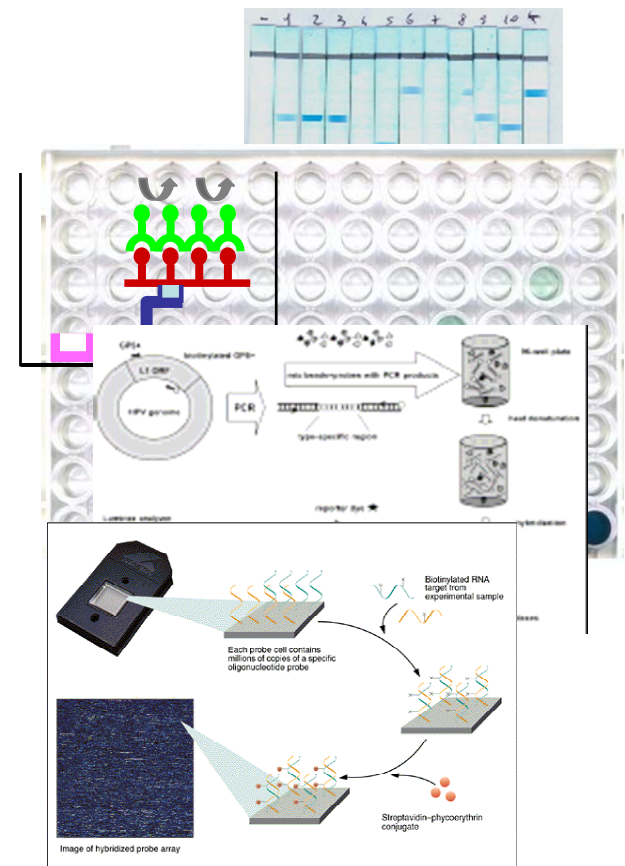
TEST DI TIPIZZAZIONE

- Permettono di definire il/i genotipi di HPV HR responsabili dell'infezione

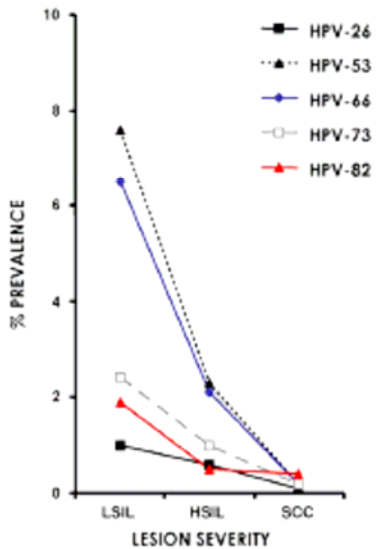
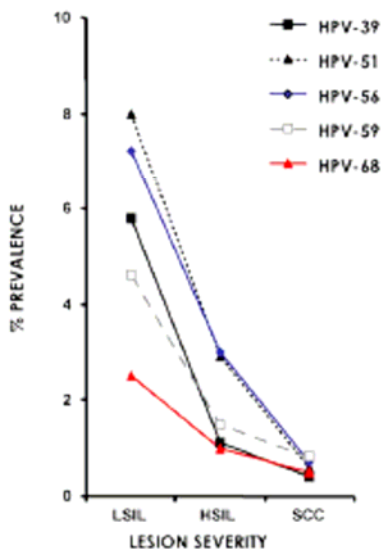
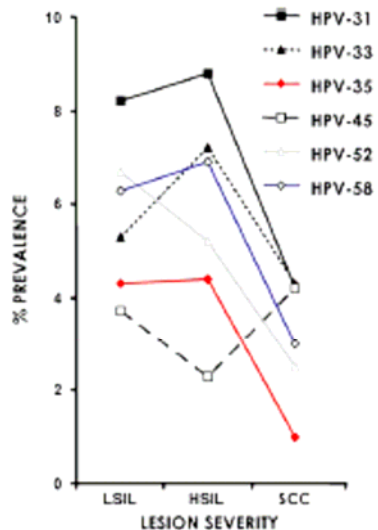
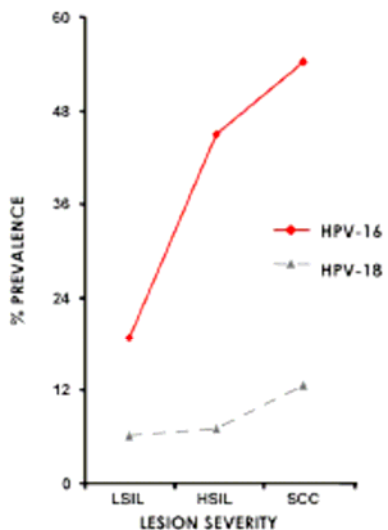
– Test in uso:

➤ Saggi di PCR seguiti da tipizzazione in:

- RFLP
- Sequenziamento
- Line Array (LA Roche) o Line Probe Assay (LiPA Innogenetics)
- PCR + ELISA/EIA
- Probe DNA beads (HC III Digene)
- DNA Microarray




PREVALENZA HPV GENOTIPO-SPECIFICA



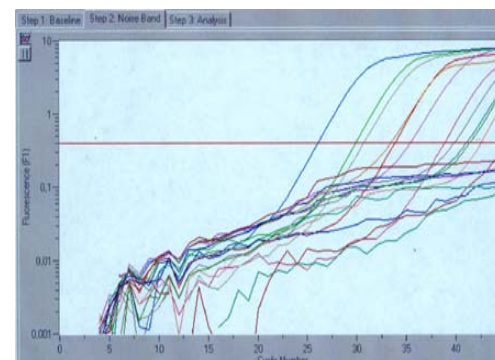
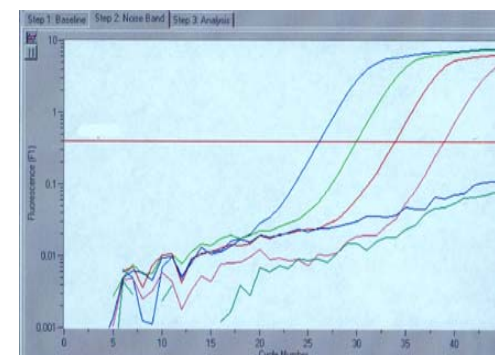
	LSIL	SCC	SCC/LSIL
HPV 16/18	35%	70%	HPV16: 2 volte HPV18: 1,5 volte
HPV 31/33/35/45/52/58	47%	20%	0,05-0,85 volte
Altri genotipi HR-HPV	60%	3%	0,01-0,02 volte

Ruolo dei test di tipizzazione per HR HPV:

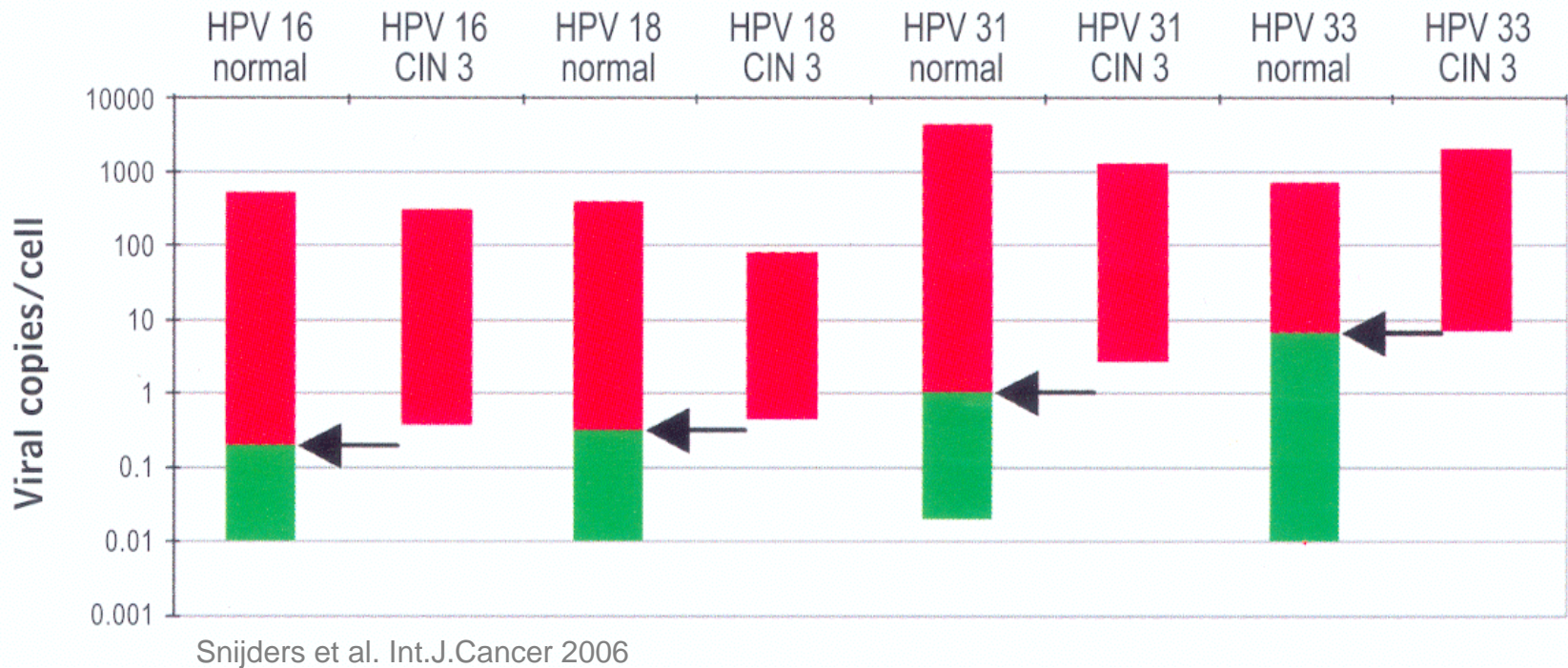
1. **Screening delle pazienti positive per HR HPV con citologia negativa/basso grado:** HPV16 e 18 conferiscono un aumentato rischio di CIN di alto grado o carcinoma (SCC e AIS/AdCa) in seguito ad una maggiore capacità di persistenza, ad una maggiore capacità trasformante di E6/E7 e ad altri cofattori (HLA II)  Più stretto controllo di pazienti con persistenza di HPV16/18 e trattamento di currettaggio endocervicale in caso di persistenza (1 anno) di HPV18
2. **Follow up di pazienti trattate per CIN2/3:** aumentato rischio di recidive in caso di persistenza di HPV16 e 18 (necessità di ulteriori studi randomizzati)

Valutazione della carica virale

- Correlazione positiva tra carica virale e rischio di lesioni di alto grado per tutti gli HR-HPV più importanti (OR più alto per HPV16)
 - **Test in uso:**
 - **Hybrid Capture II**
 - Semiquantitativo, non genotipo-specifico, nessuna conta cellulare
 - **Saggi di PCR Real time:** amplificazione con monitoraggio in tempo reale della quantità di DNA di HPV amplificato (SyBR Green, FRET, TaqMan o beacons). Quantificazione dei campioni per interpolazione sulla curva di calibrazione (standard).
 - Permettono di valutare la carica virale genotipo-specifica e la cellularità
 - Permettono di definire dei valori soglia di rischio per ciascun genotipo



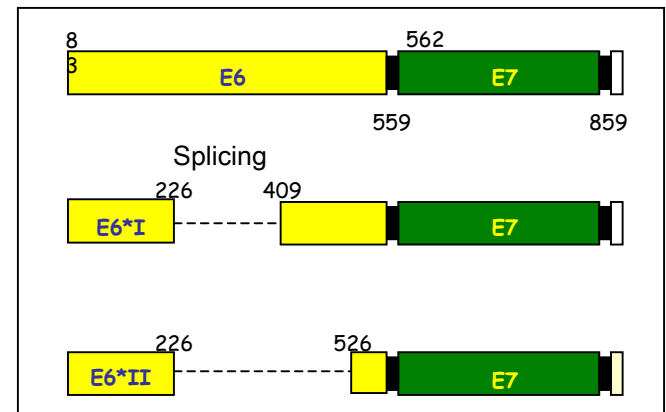
Valore soglia di carica virale per il rischio di CIN3 in donne con citologia normale positive a HPV16, 18, 31 e 33



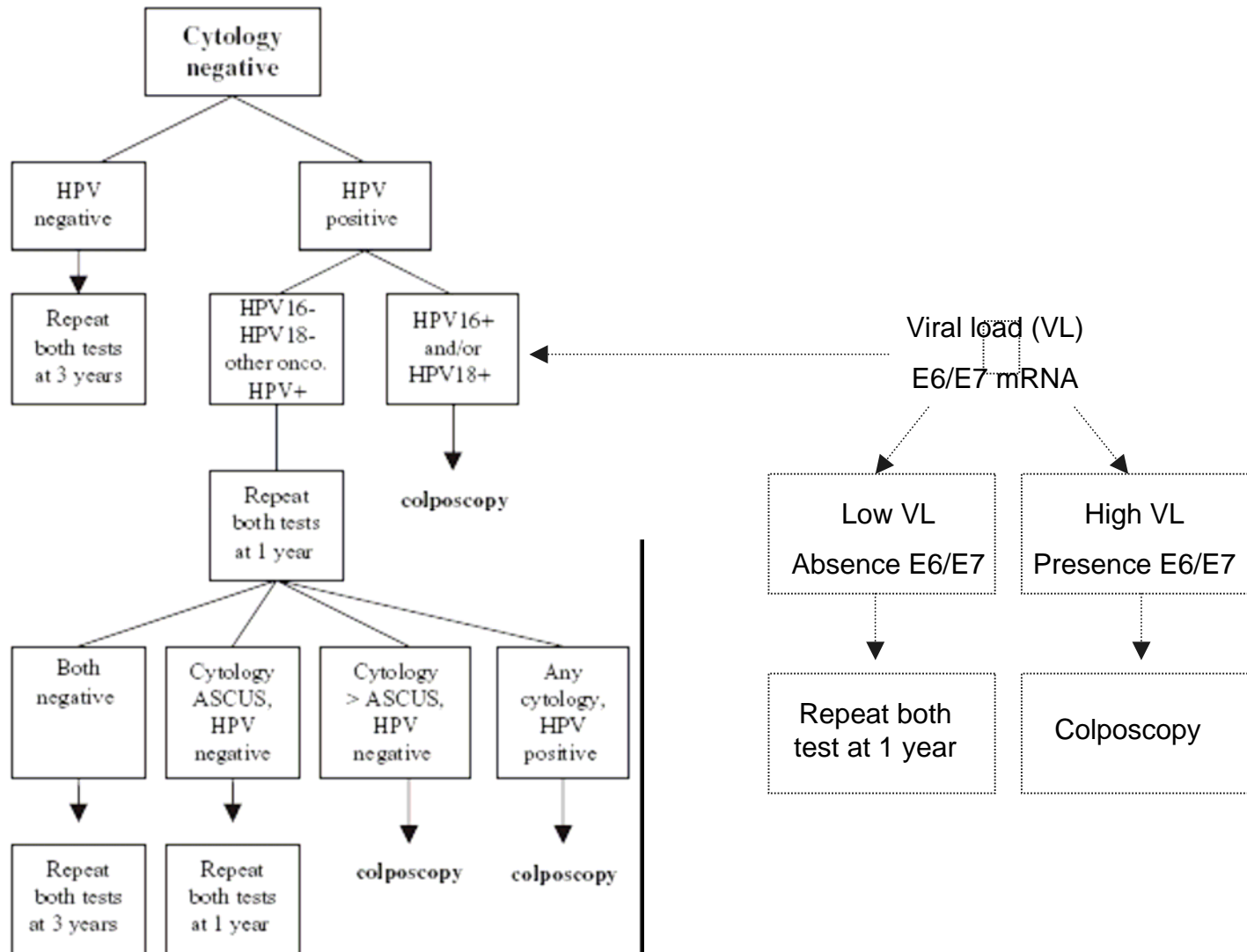
Soglia 33° percentile

Valutazione dell'espressione di E6/E7

- I metodi di PCR e ibridazione per ricerca e tipizzazione del DNA di HPV non sono in grado di distinguere infezioni attive, persistenti e destinate a progredire da infezioni che regrediranno → **marker di evoluzione è l'espressione delle oncoproteine E6/E7 di HR-HPV**
 - Espressione di E6/E7 mRNA in pazienti ASCUS/BMD conferisce maggiore rischio di sviluppo di CIN2/3 rispetto alle donne mRNA-negative. Maggiore rischio di recidive nel FU post trattamento.
 - E6/E7 mRNA sembra correlare con la persistenza dell'infezione
 - Tecniche in uso:
 - **NASBA (NorChip)**
[HPV16, 18, 31, 33, 45]
 - **RT-Real Time PCR (home-made)**
[permettono l'analisi dei diversi trascritti di E6 di HPV16]



POSSIBILE ALGORITMO PER LO SCREENING in caso di citologia neg



HPV-DNA TEST NELL'ERA DEI VACCINI

- In seguito all'implementazione della vaccinazione si avrà nei prossimi 8-10 anni una diminuzione delle anomalità citologiche da HPV (> LSIL); conseguentemente i programmi di screening cervicale diverranno meno intensi e gli intervalli più larghi
- Visto che i vaccini coprono oggi solo dall'infezione da HPV16 e 18 (più i LR-HPV 6 e 11), è importante che tutte le donne, vaccinate e non, continuino ad essere inserite nei programmi di screening per il carcinoma cervicale, nel follow up dei pap-test anormali e nel trattamento delle lesioni pre-neoplastiche
- Saranno sempre più importanti i test per la tipizzazione di un ampio spettro di HR-HPV, i quali permetteranno di definire delle categorie di rischio
- Altri marker molecolari (viral load, mRNA) andranno valutati per la definizione di categorie di rischio