

## PROGETTO IST: UNITÀ OPERATIVA DI FIRENZE

Patrizia Bordonaro (a), Viola Magini (a), Gian Maria Rossolini (b)

(a) SOD Laboratorio Generale-Centro Prelievi, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

(b) Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università di Firenze

Le Infezioni Sessualmente Trasmesse (IST) rappresentano un problema emergente di Sanità Pubblica vista l'ampia diffusione nella popolazione e le ingenti risorse finanziarie che vengono impiegate per la diagnosi e il trattamento (1).

I CDC statunitensi (*Centers for Disease Control and Prevention*) segnalano 19 milioni di nuovi casi di IST per anno; la metà di queste infezioni si verifica nei soggetti di età compresa tra i 14-24 anni. I dati epidemiologici relativi all'Europa sono raccolti dai vari stati membri attraverso l'ECDC (*European Center for Disease Prevention and Control*). I dati che descrivono la situazione italiana sono forniti dal Ministero della Salute (IST a notifica obbligatoria in classe II) e dall'Istituto Superiore di Sanità attraverso la raccolta coordinata proveniente dai centri IST e dai laboratori di microbiologia clinica facenti parte delle due sorveglianze sentinella. In Europa, le stime sono in aumento, questo potrebbe in parte essere dovuto anche alla disponibilità di test diagnostici più sensibili e all'aumento di programmi di screening portati avanti da vari stati membri.

Alcune popolazioni sono maggiormente colpite, in particolare i maschi che fanno sesso con maschi (MSM), gli individui con grave immunodeficienza, le donne e gli adolescenti in cui si riscontra una maggiore suscettibilità biologica, legata a tessuti genitali ancora immaturi che permettono una maggiore recettività ai patogeni.

Un elemento da sottolineare è anche il fatto che le IST tendono a coesistere, spesso i condilomi genitali da Papillomavirus si accompagnano all'infezione genitale da Herpesvirus e le infezioni da *Chlamydia trachomatis* vengono frequentemente rilevate assieme all'infezione gonococcica. Le IST sono strettamente associate all'infezione da HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) attraverso una sinergia epidemiologica che rafforza la diffusione di entrambe (2): pertanto chi presenta una IST ha un rischio molto più alto di trasmettere e di acquisire l'HIV. Da questa ultima considerazione nasce l'importanza della necessità di una diagnosi precoce delle IST.

Il Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Firenze, Direttore Prof. G. Rossolini, ha partecipato al Progetto: "Percorso diagnostico-assistenziale delle IST: individuazione di criticità e inapproprietezze nei percorsi; proposte operative di implementazione del sistema territoriale per un corretto inquadramento diagnostico-assistenziale: la scelta dei metodi di laboratorio nella diagnosi delle infezioni sessualmente trasmesse. Durante questo studio multicentrico della durata di 2 anni (marzo 2017/marzo 2019) sono stati arruolati 148 pazienti, inviati all'ambulatorio di microbiologia da specialisti interni all'Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi (AOUC) quali urologi, infettivologi, ginecologi, dermatologi. Molto spazio è stato dedicato all'accoglienza e al counseling con il paziente, sia per avere una raccolta dati più reale, sia per incrementare l'adesione del paziente al protocollo e per avere un feedback positivo.

Le IST diagnosticate in ordine di frequenza sono state: *Mycoplasma genitalium* nel 38,5% dei casi, *Chlamydia trachomatis* nel 26,5%, HPV nel 17,6%, *Neisseria gonorrhoeae* nel 10,8%, *Trichomonas vaginalis* nel 9,5% e Herpes virus tipo 1 e tipo 2 (HSV1, HSV2) nell'8,8%.

Nell'ambito di questo studio sono state approfondite le infezioni sostenute da *Human Papilloma Virus* (HPV), essendo l'HPV stato individuato come causa diretta di neoplasia cervicale e, seppure con percentuali di attribuzione differenti, anche di altri distretti corporei quali

vagina (70%), vulva (40%), ano (90%), pene (50%) e orofaringe (26%, inclusi i tumori delle tonsille e della base della lingua) (dati Epicentro ISS).

Per quanto riguarda l'epidemiologia HPV, i reali tassi di prevalenza e incidenza dell'infezione possono risultare imprecisi a causa dell'assenza di obbligo di notifica di questa IST e dell'estesa dispersione dei pazienti in vari ambiti assistenziali (3). Relativamente alle donne, i dati di prevalenza mostrano un picco delle infezioni intorno ai 25 anni; per quanto riguarda i soggetti di sesso maschile, tra i 18 e i 70 anni, l'infezione ha una prevalenza complessiva di circa il 65%, che rimane costante nel corso della vita. La stima della prevalenza nella popolazione maschile è ulteriormente complicata in ragione del fatto che non esistono programmi di screening, né test validati per determinare la presenza dell'infezione (4).

Gli oltre 40 tipi di HPV che infettano le mucose e la cute del tratto ano-genitale sono stati suddivisi in tipi a basso o alto rischio di trasformazione neoplastica. Nella popolazione giovane prevalgono i genotipi ad elevato rischio oncogeno; il sottotipo virale più frequentemente isolato in Italia è risultato HPV 16. Numerosi studi concordano nell'affermare che l'HPV 16 e 18 sono responsabili del 70% di tutti i tumori della cervice a livello mondiale (5).

L'infezione da HPV è estremamente frequente nella popolazione: si stima, infatti, che fino all'80% delle donne sessualmente attive contragga l'HPV nel corso della propria vita e che oltre il 50% si infetti con un tipo ad alto rischio oncogeno (6-8). La storia naturale dell'infezione è fortemente condizionata non solo dall'infezione stessa, ma anche dall'equilibrio che si instaura fra ospite e agente infettante. L'importanza del ruolo del sistema immunitario si può inoltre desumere osservando il comportamento dell'infezione nei soggetti immunocompromessi. La maggior parte delle infezioni è asintomatica, reversibile e transitoria, poiché il virus viene eliminato dal sistema immunitario prima che si verifichi un effetto patogeno (7): il 70% delle nuove infezioni si risolve spontaneamente in un anno e il 91% in due anni (9, 10). In una percentuale minore di casi, l'infezione può diventare persistente e si può verificare l'integrazione del genoma virale all'interno del DNA cellulare; in questo caso, si possono sviluppare lesioni precancerose che possono evolvere verso il carcinoma della cervice. L'integrazione del DNA virale implica la distruzione di parte del genoma virale e alterazioni geniche cellulari; in particolare, nel genoma del virus si ha la trascrizione incontrollata dei geni precoci E6 ed E7, codificanti per le relative proteine: la proteina E6 impedisce la riparazione del DNA e l'azione pro apoptotica di p53, mentre la proteina E7 incrementa la sintesi di DNA e blocca la differenziazione cellulare (11-14).

In Italia, come negli altri Paesi industrializzati, l'incidenza e la mortalità per cervicocarcinoma hanno mostrato un progressivo declino dal 1994 al 2016, con una riduzione del 70% della mortalità per cervicocarcinoma; questa tendenza, riflette l'effetto preventivo dei programmi organizzati di screening che a partire dal 1994 si sono affermati sul territorio nazionale (15).

## **Metodiche di diagnosi e medicina di laboratorio per HPV**

Presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'AOUC Firenze si effettua la ricerca dell'HPV. Attraverso un test molecolare, e non morfologico, per la ricerca del DNA virale che è meno vincolato all'interpretazione soggettiva da parte dell'operatore ed è intrinsecamente più sensibile e meno soggetto a falsi negativi.

Questo test ha un elevato valore predittivo negativo: qualora risulti negativo, il rischio di sviluppare una lesione CIN3 o superiore nei 60 mesi successivi è estremamente basso (15, 16).

Presso l'ambulatorio di Microbiologia, dove si eseguono le visite per la diagnosi di IST, il prelievo per la ricerca dell'HPV viene effettuato tramite spatola di Ayre e brush a livello cervicale e tramite *scraping* (grattamento) a livello dell'ano e del pene, cercando di recuperare più cellularità possibile. Il materiale raccolto viene stemperato in dispositivo Thin-Prep, contenente la soluzione PreservCyt solution. Il Thin-Prep è stata la prima tecnica in fase liquida ad essere approvata dalla Food and Drug Administration (FDA), con successiva approvazione degli Enti di Controllo Europei (17).

Questa soluzione garantisce una riduzione del numero dei campioni biologici inadeguati (inferiore a 0,3%), una riduzione (fino al 93%) dei prelievi giudicati non idonei per presenza di sangue, muco, o altro; inoltre permette un processo analitico totalmente automatico e la riproducibilità dei risultati; il campione rimane stabile per 30 giorni. Il Thin-Prep può essere utilizzato anche come co-test, sia per la determinazione del PAP test che dell'HPV test.

Il test utilizzato presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia AOUC Firenze, per la diagnosi di HPV è Seegene Anyplex II. Questa metodica permette la simultanea determinazione e tipizzazione di 28 HPV, da un singolo campione e in una singola PCR real time, determina 19 HPV ad alto rischio (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) e 9 HPV a basso rischio (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70). Il kit è basato su due tecnologie Seegene che rispettivamente assicurano un'alta sensibilità e specificità di reazione (DPO, *Dual Priming Oligo*) e la rilevazione di più analiti/patogeni nello stesso canale di fluorescenza all'interno di un unico tubo di reazione permettendo anche il dosaggio semiquantitativo degli analiti (TOCE, *Tagging Oligonucleotide Clavage & Extension*). La metodica, in real time, consente di monitorare il processo di amplificazione durante il suo svolgimento; alla fine della serie di cicli di replicazione viene costruita la curva di rappresentazione dell'esito del test e permette di individuare e quantificare la presenza del virus dalla posizione dei picchi a specifiche temperature (11).

I pazienti a cui è stata fatta diagnosi di HPV vengono sottoposti al test HIV; le donne vengono inviate all'ambulatorio di colposcopia e gli uomini all'ambulatorio delle malattie infettive/tropicali per il trattamento e il follow-up.

In precedenza è stata sottolineata l'importanza dell'HPV nella patogenesi del cancro cervicale, così come il ruolo della risposta immunitaria nel controllo dell'infezione. Negli ultimi decenni, sulla base di questi presupposti, si è svolta un'intensa attività di ricerca che ha portato alla messa a punto di un vaccino in grado di eliminare quello che viene considerato l'agente causale delle lesioni cervicali, vale a dire l'infezione da HPV (8). I primi due vaccini resi disponibili per la prevenzione delle infezioni da HPV sono stati il bivalente, rivolto verso i genotipi HPV 16 e 18, e il tetravalente, attivo nei confronti dei genotipi HPV 6, 11, 16 e 18. Questi due vaccini hanno già consentito di raggiungere importanti benefici clinici, ma un ulteriore importante passo avanti in ambito di prevenzione primaria è rappresentato dalla messa a punto del vaccino 9-valente. Esso è rivolto verso sette tipi di HPV ad alto rischio oncogeno (HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58) e verso due tipi di HPV a basso rischio (6 e 11) che sono la causa del 90% dei condilomi genitali. Questo strumento di prevenzione ha il potenziale di prevenire il 97,4% delle lesioni di alto grado della cervice uterina, dei tumori del collo dell'utero, ma anche di altre neoplasie HPV correlate, per le quali non esiste purtroppo uno screening sistematico. Bisogna sottolineare che il vaccino non è alternativo alla partecipazione ai programmi di screening, che devono essere comunque effettuati dal paziente nelle fasce di età e nei tempi consigliati, dal momento che i vaccini disponibili non prevenono la totalità delle infezioni da HPV ad alto rischio (18-20).

## Bibliografia

1. World Health Organization. *Global Health Sector Strategy on Sexually Transmitted Infections 2016-2021*. Geneva: WHO; 2016.
2. World Health Organization. *Guidelines for sexually transmitted infection*. Geneva: WHO 1999.
3. Beltrame A., Giuliani M., Suligo B. L'epidemiologia dell'infezione genitale da HPV in era pre-vaccino. *STI Review* 2008;1(1):3-9.
4. Bonnanni P., Boselli F., Stigliano CM. *et al.* HPV:Evidenze e nuove prospettive. *Rivista di ostetricia ginecologia pratica e medicina perinatale* 2016;31(1):2-21.
5. Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, *et al.* Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369:2161-70.
6. Carozzi FM. Le basi biologiche dei vaccini per il papillomavirus umano (HPV). *Epidemiol Prev* 2007;31(2):12-19.
7. Frazer IH, Cox JT, Mayeaux EJ *et al.* Advances in prevention of cervical cancer and other human papillomavirus-related diseases. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:S65-81.
8. Petraglia F, Pelusi G, Bocchi C, *et al.* *Ginecologia e Ostetricia*. Milano: Poletto editore; 2011.
9. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005;32S:S16-S24.
10. Ronco G. Epidemiologia dell'infezione genitale da Hpv e delle sue complicazioni e utilizzo della ricerca molecolare per lo screening del cancro del collo dell'utero. *Epidemiol Prev* 2007;31(2):6-10.
11. Liverani CA, Mojana G. Infezione genitale da HPV: esami di laboratorio. *La Colposcopia in Italia* 2005;20(2):12-16.
12. White EA. Manipulation of epithelial differentiation by HPV oncoproteins. *Viruses* 2019;11(4):369.
13. Han MS, Lee JM, Kim SN *et al.* Human Papillomavirus 16 oncoproteins Downregulate the Expression of miR-148a-3p, miR-190a-5p, and miR199-b5p in Cervical Cancer. *Biomed Res Int* 2018:1942867.
14. Gupta SM, Mania-Pramanik J. Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis. *J Biomed Sci* 2019;26(1):28.
15. Cristoforoni PM, Stigliano CM. Pap test e HPV test nella prevenzione del cervicocarcinoma: aspetti clinici e risvolti medico-legali. In: Stigliano CM, Morgera R (Ed.). *Aspetti medico-legali in ginecologia e ostetricia*. Milano: AOGOI; 2017. p. 231-42
16. Ronco G, Biggeri A, Confortini M *et al.* Ricerca del DNA di papillomavirus umano (HPV) come test primario per lo screening dei precursori del cancro del collo uterino – HTA Report. *Epidemiol Prev* 2012;36(3-4)suppl 1:e1-72.
17. Ronco G, Confortini M, Maccallini V, *et al.* Uso della citologia in fase liquida nello screening dei precursori del cancro del collo uterino – HTA Report. *Epidemiol Prev* 2012; 36(5)suppl 2:e1-33.
18. Zhang S, Batur P. Human papillomavirus in 2019: An update on cervical cancer prevention and screening guidelines. *Cleve Clin J Med* 2019;86(3):173-8.
19. Sheikh S, Biundo E, Courcier S, *et al.* A report on the status of vaccination in Europe. *Vaccine* 2018;36(33):4979-92.
20. Signorelli C, Odone A, Ciorba V, *et al.* Human papillomavirus 9-valent vaccine for cancer prevention: a systematic review of the available evidence. *Epidemiol Infect* 2017; 145(10):1962-82.