

IL TEST HPV-RNA



Le infezioni genitali da HPV sono molto comuni e, prevalentemente, trasmesse sessualmente. Degli oltre 100 tipi di HPV, almeno 30 vengono trasmessi attraverso il contatto sessuale. La maggior parte delle infezioni occorrono senza alcun sintomo e sono transitorie, essendo eradicata nel giro di pochi anni senza alcun trattamento. In alcuni casi, tuttavia, l'infezione persiste per molti anni e può causare anomalie cellulari, aumentando il rischio di sviluppare il tumore della cervice.

PAP TEST

Il pap-test è sempre stato considerato il “gold - standard” per valutare l'occorrenza e il grado di trasformazione delle cellule della cervice uterina. La sua introduzione, infatti, ha diminuito la mortalità per questa neoplasia perché il test è in grado di identificare non solo i tumori quando sono ancora piccoli e quindi guaribili, ma anche e soprattutto le lesioni benigne (CIN, L-SIL, H-SIL) che possono trasformarsi col tempo in un tumore maligno. Questa tecnica, pur mantenendo la sua validità, ha mostrato alcuni limiti quali variabilità, soggettività, scarsa sensibilità e indeterminazione nella classificazione dei casi *ASCUS* (cellule squamose atipiche).

Tutte le linee guida enfatizzano, quindi, l'utilità di affiancare l'esame citologico a test molecolari per l'HPV e numerose metodologie diagnostiche sono state sviluppate, parallelamente all'aumentata conoscenza dei meccanismi patogenetici responsabili dello sviluppo del tumore del collo dell'utero.

HPV-DNA TEST

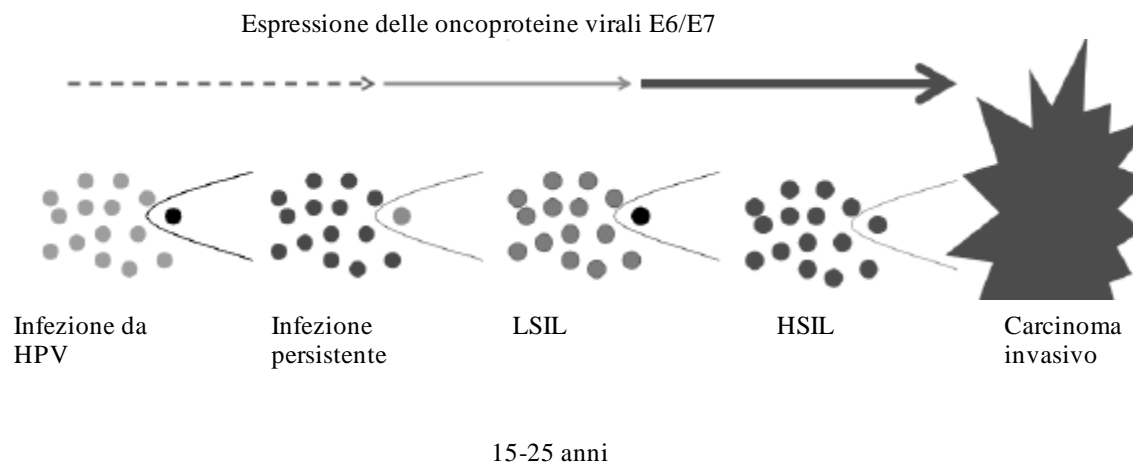
La determinazione del DNA virale (*DNA-HPV test*) è tra le tecniche più utilizzate nella prevenzione del carcinoma della cervice, in quanto la presenza del virus HPV è un forte indicatore associato alle lesioni squamose intraepiteliali (SIL) e a tumori della cervice uterina (chi non è portatore del virus ha un rischio bassissimo di sviluppare queste lesioni). Questa tecnica diagnostica è caratterizzata da una sensibilità elevata (superiore al 95%) e, associata al test di genotipizzazione, migliora notevolmente l'efficacia dello screening. Il test dell'HPV-Genotyping permette infatti di distinguere, nell'ambito della famiglia dei virus HPV, quelli *potenzialmente* ad alto rischio oncogeno (16-18- 45 e 56 e, meno frequenti il 31-33-35-51-52) e quelli a basso rischio (HPV 6-11-42-43-44-54-55). Sia i virus ad alto rischio che quelli a basso rischio possono causare una crescita anormale delle cellule, ma solo quelli ad alto rischio possono sviluppare il tumore. Il genotipo HPV-16 è in assoluto il genotipo ad alto rischio più diffuso (responsabile del 60% dei casi di tumori del collo dell'utero) e, insieme all'HPV-18, 45, 31 e 33, giustifica più dell'80% dei cervicocarcinomi. E' importante notare, comunque, che anche la maggioranza delle infezioni ad alto rischio causano il cancro *solo in alcuni casi*.

Il test dell'HPV-DNA è capace, quindi, di rilevare la presenza del virus, ma *non* la sua attività oncogenica e *non* è indicativo della possibile evoluzione delle lesioni pre-cancerose verso la forma tumorale.

HPV-RNA TEST

Oggi finalmente sono disponibili tecnologie che propongono approcci e metodi diagnostici che indirizzano l'attenzione verso fattori di rischio più specifici, come le oncoproteine E6/E7, che promuovono la replicazione cellulare e sono responsabili della trasformazione maligna. Il tumore della cervice è caratterizzato dall'over-espressione delle proteine E6/E7 dei ceppi ad “alto rischio” e lo studio dell'espressione di E6 ed E7 è divenuto l'indicatore *effettivo* del rischio di sviluppare il tumore.

E' stato dimostrato, infatti, che il livello di espressione di E6/E7 è un fattore prognostico negativo *indipendente* nel tumore della cervice, secondo solo allo stato dei linfonodi e che il numero di copie di DNA virale non si correla con i livelli di mRNA di E6/E7 (evidentemente perché non tutte le copie di DNA sono trascrizionalmente attive). Il metodo di rilevazione dell'mRNA ha quindi un Valore Predittivo Clinico maggiore rispetto ai metodi basati sul DNA e questo consente di inquadrare correttamente un numero più elevato di pazienti con citologia e/o istologia alterate.



Patogenesi del carcinoma della cervice: il meccanismo patogenetico comincia con l'infezione da parte del virus HPV delle cellule epiteliali cervicali e richiede tra i 15 e i 25 anni. Dopo l'infezione primaria, si formano cloni individuali che sfuggono ai normali meccanismi cellulari di controllo della crescita. L'infezione persistente determina vari cambiamenti cellulari e genomici che risultano: (i) nell'integrazione del virus del genoma umano con linearizzazione degli episomi virali; (ii) nell'over-espressione degli oncogeni E6/E7; (iii) nella deregolazione del ciclo cellulare con concomitante incremento della proliferazione cellulare; (iv) nell'instabilità genomica ed aneuploidia, che determina, in ultima analisi, l'espansione di cellule con potenziale oncogenico e metastatico.

QUANDO EFFETTUARE IL TEST?

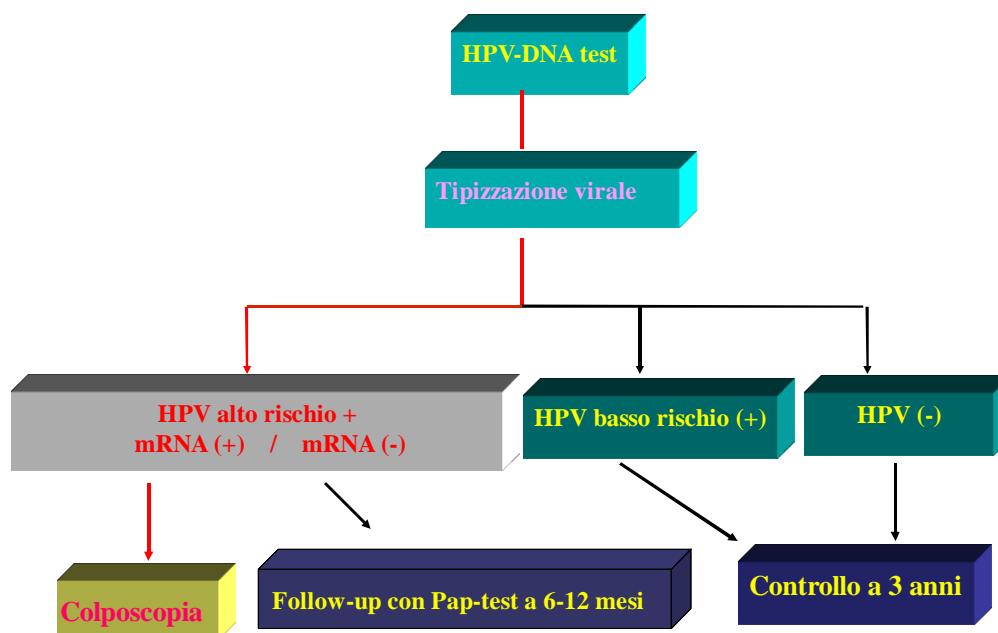
Il test è molto sensibile ed è quindi in grado di rilevare le infezioni allo stadio iniziale, molto prima che le alterazioni cellulari siano visibili in un normale campione di cellule studiato al microscopio. Attraverso l'identificazione dell'RNA messaggero che codifica per le proteine oncogeniche E6/E7, questo test permette di evidenziare la presenza di cellule trasformate e di seguire la progressione del tumore, laddove i test tradizionali (DNA-HPV) possono solo dare evidenza della presenza del virus.

Il test è consigliato:

- 1) nel caso di soggetti risultati positivi al test dell'HPV-DNA;
- 2) e in soggetti positivi alla genotipizzazione per l'alto rischio.

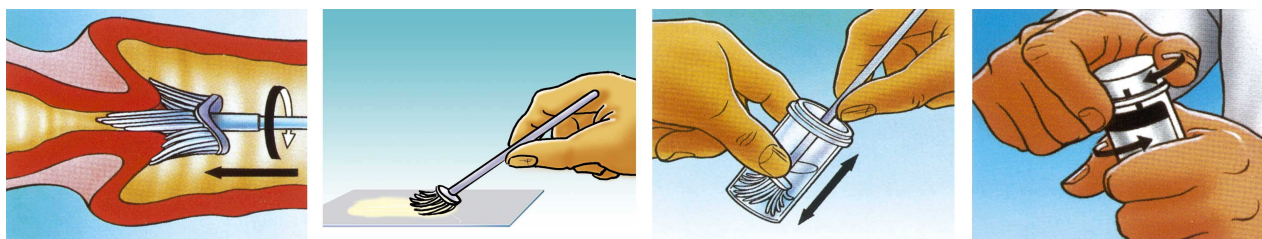
Il test dell'HPV RNA è significativo anche in tutti i casi di risultati citologici dubbi, nei casi ASCUS e può essere utilizzato anche dopo trattamento per permettere un corretto follow-up post operatorio.

La ricerca dell'mRNA, consentendo la rivelazione dell'espressione dei marcatori oncogenici E6/E7, permette di effettuare un corretto management clinico delle infezioni HPV ad alto rischio, consentendo di garantire un migliore e più precoce trattamento delle pazienti. Di seguito viene riportato un esempio di algoritmo diagnostico.



COME EFFETTUARE IL TEST

Con un unico prelievo è possibile effettuare il Pap-Test ed eventualmente anche l'HPV-DNA e l'HPV-RNA test, purché le cellule siano presenti in numero adeguato e correttamente conservate in una soluzione di trasporto (ThinPrep).



Per effettuare il prelievo:

- 1) utilizzare il brush come indicato in figura per il prelievo del campione
- 2) trasferire il materiale cellulare sul vetrino per l'analisi citologica e fissarlo come da procedura
- 3) mettere la spazzola per cellule nel PreservCyt buffer. Agitare gentilmente la spazzola per liberare le cellule rimanenti. Buttare la spazzola
- 4) chiudere il contenitore ed identificarlo. Il contenitore può essere conservato a 2-8°C per 1 settimana oppure a -20°C fino ad un mese prima dell'estrazione dell'RNA nel laboratorio di analisi.

Bibliografia

1. Walboomers J et al, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J. Pathol. 1999; 189:12-19.
2. Zur Hausen et al, Papillomaviruses and cancer : from basic studies to clinical application. Nat. Rev. Cancer 2002; 2:342-50.
3. Kahn et al, The elevated 10-year risk of high risk of cervical cancer in women with HPV type 16 or 18. J. Nat. Cancer Inst 2005; Vol. 97, n814.
4. Lie et al, DNA- versus RNA-based methods for HPV detection in cervical neoplasia Gynec. Onc. 2005; 97: 908-915.
5. Molden et al, Comparison of HPV mRNA and DNA detection : a cross-sectional study of 4136 women >30 years of age with a 2-years follow-up of high grade sqamous intraepithelial lesion, Int. J. Cancer 2005; 114:973-976.
6. Cuschieri et al, HPV type specific DNA and RNA persistence-implications for cervical Disease Progression and monitoring, J. Med. Virol.2004; 73:65-70.
7. Molden et al, HPV E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age, Gynec. Onc. 2006; 100:95-100.