

Studi su una potenziale associazione fra l'Herpesvirus umano 7 e la gastrite cronica

M. Boni, S. Boccia¹, A. Gonelli, A. Pozzoli¹, C. Rizzo¹, E. Cassai, D. Di Luca

Sez. Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica,
Università degli Studi di Ferrara

¹ Unità di Gastroenterologia, Ospedale S. Anna, Ferrara

Riassunto. L'Herpesvirus umano 7 (HHV-7) è un virus linfotropico normalmente presente nella popolazione adulta sana il cui ruolo patogenetico non è ancora stato chiarito. Per valutare un possibile coinvolgimento di HHV-7 con alcune patologie umane, sono state analizzate per la presenza del virus biopsie gastriche di pazienti affetti da gastrite cronica. Nelle analisi condotte mediante PCR è risultato che il 78% delle biopsie presentavano il DNA di HHV-7. Inoltre, è stato possibile ritrovare sequenze virali anche in campioni negativi per *Helicobacter pylori*, un batterio frequentemente associato alla gastrite cronica. Gli studi condotti, hanno dimostrato che HHV-7 era specificamente associato al tessuto gastrico e non al sangue circolante in tale distretto ed il carico virale si presentava maggiore a livello della mucosa gastrica rispetto alle cellule mononucleate del sangue periferico. Tuttavia, il DNA di HHV-7 continuava a persistere anche dopo la risoluzione della lesione gastrica e la sua presenza non era associata a sintomi specifici. È stata infine condotta un'analisi sui trascritti virali associati alla fase replicativa analizzando in RT-PCR l'RNA estratto dalle biopsie. L'assenza dei trascritti ha dimostrato che a livello gastrico HHV-7 instaura un'infezione latente.

Ulteriori studi potranno chiarire se la riattivazione del virus in tale distretto può essere associata a specifiche patologie gastriche.

Abstract. Human Herpesvirus 7 (HHV-7) is a lymphotropic herpesvirus commonly detected in the healthy human population, but viral infection is still not clearly associated to human disease. To evaluate a possible etiological role of HHV-7, biopsies from patients with chronic gastritis inflammation were analysed for the presence of virus infection. Analysis by PCR showed that 78% of gastric biopsies harboured viral DNA. Interestingly, viral sequences were detected also in samples negative for *Helicobacter pylori*, a bacterium frequently associated to chronic gastritis. HHV-7 was associated specifically with gastric mucosa and not with residual blood irrigating the tissue, and viral load was higher in gastric tissue than in peripheral blood mononuclear cells. However, HHV-7 DNA persisted also after remission of gastric inflammation. RNA was extracted from gastric biopsies and analysed by RT-PCR for the presence of viral transcripts specifically associated to viral replication. The absence of viral mRNA showed that HHV-7 established a latent infection in gastric mucosa.

Further studies will indicate whether HHV-7 can reactivate and support diseases in this body district.

Introduzione

L'Herpesvirus umano 7 (HHV-7) è stato isolato per la prima volta nel 1990 da linfociti T attivati di un donatore sano (11).

Il virus ha un tropismo prevalente per le cellule T e la molecola CD4 probabilmente rappresenta una parte del complesso recettoriale delle cellule suscettibili all'infezione (21). Infatti, la propagazione "in vitro" di HHV-7 è possibile solo in colture primarie

di cellule T CD4+ ed in un'unica linea cellulare continua, SupT1 (12). La presenza della molecola CD4 non è di per sé sufficiente per la replicazione del virus in quanto molte linee cellulari CD4+ non sono suscettibili all'infezione litica (2, 5).

Il ruolo patogenetico di HHV-7 non è ancora completamente conosciuto e le informazioni disponibili nella letteratura scientifica sono ancora limitate. Il virus è associato ad alcuni casi di exanthema subitum, o sesta malattia (29), una malattia infantile che

di solito è causata da un altro herpesvirus umano, HHV-6. L'infezione primaria in età pediatrica può causare una malattia febbrile benigna (27), con rare complicazioni a livello del sistema nervoso centrale (30). Tuttavia la frequenza con cui HHV-7 può provocare malattie nei bambini non è ancora chiara ed in molti casi l'infezione primaria non porta a malattie sintomatiche. Eventuali associazioni fra HHV-7 ed altre patologie, fra cui la pityriasi rosea (9), non sono state confermate (17). Si ipotizza che HHV-7 possa svolgere un ruolo patogenetico indiretto, dal momento che il virus è in grado di riattivare HHV-6 dallo stato latente (16) portando quindi alle diverse manifestazioni cliniche legate a tale riattivazione.

L'infezione sostenuta da HHV-7 è altamente prevalente nella popolazione umana. La maggior parte dei bambini viene infettata entro i tre anni di età (4) e oltre il 90% della popolazione adulta possiede anticorpi specifici contro il virus (33). Il DNA virale viene ritrovato nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) nel 50-80% degli individui adulti sani (8) a livelli di circa 300 copie/10⁶ cellule (19). HHV-7 è presente nei PBMCs in uno stato latente come viene dimostrato dall'assenza dei trascritti virali nei PBMCs di donatori di sangue sani, positivi per il DNA del virus (23). HHV-7 si trova spesso anche nella saliva (32). Il virus viene isolato frequentemente dalla saliva di soggetti adulti sani e le ghiandole salivari contengono sia DNA (7) che proteine virali (18). Questi dati dimostrano che le ghiandole salivari costituiscono un serbatoio di persistente replicazione virale e che probabilmente la saliva rappresenta la principale via di trasmissione del virus. Non si sa ancora con esattezza se HHV-7 possa essere isolato in distretti diversi dal sangue o dalle ghiandole salivari. Recentemente il DNA virale è stato ritrovato nel 10% dei campioni di latte materno (13) ed è stata dimostrata la presenza di bassi livelli di antigeni virali in campioni di ghiandole mammarie (18). Questi dati suggeriscono una possibile persistenza di HHV-7 a livello delle ghiandole mammarie ed una probabile via di trasmissione attraverso il latte materno. Inoltre, una piccola percentuale di tamponi eseguiti sulla cervice uterina di donne in gravidanza sono risultati PCR-positivi per HHV-7 (25) così come alcuni campioni di urina provenienti da individui sia immunocompetenti che immunocompromessi (14).

Nel presente lavoro è stata analizzata la presenza di HHV-7 in biopsie gastriche ottenute da pazienti affetti da gastrite cronica. Tale patologia è frequentemente associata all'infezione sostenuta da un batterio gram negativo, *Helicobacter pylori* (3). *H. pylori* è in grado di alterare la fisiologia del distretto gastrico inducendo infiammazione e comparsa di infiltrato linfoide a livello della mucosa (1). L'eradicazione di

H. pylori con il trattamento farmacologico porta alla scomparsa dei sintomi associati alla gastrite e alla scomparsa della patologia (31).

Alcune osservazioni indicano l'opportunità di analizzare una possibile associazione tra HHV-7 e la gastrite cronica. Infatti non tutti i pazienti affetti dalla patologia mostrano evidenze d'infezione sostenuta da *H. pylori*, suggerendo che altri fattori possano essere coinvolti nella patogenesi della gastrite. Inoltre l'eradicazione del batterio non porta necessariamente alla scomparsa dei sintomi clinici (28). Infine vi sono dati in letteratura che rivelano la presenza del DNA di alcuni herpesvirus quali il virus di Epstein Barr (EBV) e HHV-6 rispettivamente nel 10% e nel 14% dei campioni gastrici (10). Il ritrovamento di HHV-6 nella mucosa gastrica ha suggerito di estendere l'analisi anche ad HHV-7 in quanto questo virus è strettamente correlato ad HHV-6 (2, 22, 24), ma è maggiormente prevalente nella popolazione umana (8).

Questo studio si è proposto di determinare se: 1) HHV-7 è associato alla mucosa gastrica; 2) la presenza del virus, sia da solo che in associazione con *H. pylori*, può influenzare il decorso clinico della gastrite; 3) il virus si trova a livello gastrico in uno stato trascrizionalmente attivo.

Materiali e metodi

Pazienti e campioni

Nello studio sono stati esaminati 50 pazienti del Reparto di Gastroenterologia dell'Ospedale S. Anna di Ferrara affetti da gastrite cronica istologicamente documentata. Le biopsie sono state prelevate mediante endoscopia, dopo consenso informato. Da ogni paziente è stato prelevato anche un campione di sangue trattato con anticoagulante.

Estrazione degli acidi nucleici e Retrotrascrizione

Subito dopo il prelievo dall'antro dello stomaco, le biopsie ed i campioni di sangue sono stati congelati in azoto liquido e, successivamente, sono stati conservati a -80°C fino all'estrazione degli acidi nucleici. Il DNA è stato estratto dai campioni di mucosa gastrica come descritto precedentemente, utilizzando la digestione con proteinasi K e l'estrazione in fenolo e fenolo-cloroformio (6). L'estrazione del DNA dalle cellule del sangue periferico è stata invece eseguita mediante l'utilizzo di High Pure PCR Preparation Kit (Boehringer Mannheim). Durante l'estrazione è stata prestata particolare attenzione per evitare il rischio di possibili cross-contaminazioni tra i campioni e sono stati utilizzati dei bianchi di reazione, rappresentati dalla sola miscela di estrazione ed inseriti ogni tre campioni. La concentrazione degli acidi nucleici è stata stimata con tecniche spettro-

trofometriche, mediante lettura dell'assorbimento alla lunghezza d'onda di 260 nm.

In otto casi è stato possibile ottenere biopsie multiple che sono state analizzate anche per la presenza di trascritti virali. L'RNA totale è stato estratto dalle biopsie utilizzando la soluzione RNazol-TM-B (Tel-Test, Friendswood). L'RNA è stato successivamente trattato con DNasi per evitare in RT-PCR la produzione di risultati falsi positivi dovuti ad eventuali contaminazioni da parte del DNA virale. A tale scopo, al pellet di RNA, risospeso in un tampone costituito da 100mM NaAcetato e 5mM di MgSO₄ pH 5.0, sono state aggiunte per tre volte ad intervalli di 30 minuti, 20U di DNasi RNasi-free (Roche Diagnostic, Milano). La reazione è stata fatta proseguire a temperatura ambiente. L'RNA è stato purificato mediante due estrazioni in fenolo-cloroformio e successiva precipitazione in etanolo. Dopo un lavaggio in etanolo 75%, il pellet è stato risospeso in H₂O trattata con dietilpiricarbonato (0.1%) e conservato a -80° in presenza di 40U di inibitore delle ribonucleasi (Amersham Life Sciences, Amersham Place). La totale assenza di DNA contaminante è stata verificata mediante PCR, amplificando 200 ng di RNA totale utilizzando i primers per la β-actina umana (34). E' stato poi sintetizzato il cDNA a partire da 2 µg di RNA utilizzando il cDNA Cycle Kit (Invitrogen, Carlsbad). Il cDNA è stato ottenuto mediante estrazione in fenolo-cloroformio e precipitazione in etanolo. Dopo un lavaggio

del pellet con etanolo 75%, il cDNA è stato risospeso in H₂O e conservato a -80°, fino all'analisi mediante PCR. Per valutare l'efficienza della retrotrascrizione, diluizioni seriali del cDNA sintetizzato sono state esaminate in PCR per la presenza del messaggero della β-actina umana (34). L'analisi di RT-PCR è stata condotta utilizzando un quantitativo di cDNA corrispondente a 1.5x10⁵ cellule.

Reazione di PCR

Per determinare la positività dei campioni ad HHV-7, 1 µg di DNA (corrispondente a 1.5x10⁵ cellule diploidi) è stato analizzato in PCR nested utilizzando primers specifici per il gene U31 (23). Nel primo ciclo di amplificazione è stata utilizzata una miscela di reazione contenente 400 nM primers, 1.5 mM MgCl₂ (2.5 mM per U16/17, 2.0 mM per U31), 200 µM dNTPs e 1.25 unità di Taq polimerasi (Perkin Elmer, Foster City) in un tampone 10 mM TRIS-HCl pH 8.3, 50 mM KCl. La reazione di nested PCR è stata condotta in una miscela contenente 400 nM primers, 1.0 mM MgCl₂ (1.25 mM per U14, 2 mM per U89/90 e per U31), 200 µM dNTPs, 1.25 unità di Taq polimerasi in un tampone 10 mM TRIS-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, utilizzando come template 5 µl del prodotto di prima reazione. La sequenza di ciascuna coppia di primers, le dimensioni dei prodotti amplificati e le condizioni termiche di PCR sono mostrate in Tabella 1. La reazione di amplifica-

Tabella 1. Primers di HHV-7 e condizioni termiche di PCR.

| ORF | PCR | Sequenza nucleotidica (5'-3') | Condizioni termiche | Cicli | MgCl ₂ | Dimensioni degli amplificati (paia di basi) | |
|--------|-----|---|---|---------|-------------------|---|------|
| | | | | | | DNA | cDNA |
| U14 | P | TGCCGATTCCTACAACCTCTG | 94° 5 min | 1 | 1,5 mM | 711 | 711 |
| | N | GCTGCAAGCACAACATTCTC TAACACCGAAGAGGCTATGC CTGGAAGACCATTCTCATGC | 94° 1 min, 58° 1 min, 72° 1 min+ext. 3 sec./ciclo 72° 10 min, 4° > | 35 1 | 1,25 mM | 119 | 119 |
| U16/17 | P | TTACCGACGCTGCCAATGAT | 94° 5 min | 1 | 2,5 mM | 610 | 538 |
| | N | TGCGGGATATGCCTTTTCAGA GCTGCTGTTGTTACGTCGTT AACCGAGCTGCAAGACCTAT | 94° 1 min, 58° 1 min, 72° 1 min+ext. 3 sec./ciclo 72° 10 min, 4° > | 35 1 | 1,0 mM | 171 | 99 |
| U31 | P | GCCATAGAGAATGTTGCGGA | 94° 5 min | 1 | 2,0 mM | 755 | 755 |
| | N | TCATGCACCGGACTGACAAT CTTGAAGACGGAGATGCAAC TAAGGCGTCAACCACTTGAG | 94° 1 min, 56° 1 min, 72° 1 min+ext. 3 sec./ciclo 72° 10 min, 4° > | 35 1 | 2,0 mM | 447 | 447 |
| U42 | P | AAGCTGCAAGACGGAGTTGT | 94° 5 min | 1 | 1,5 mM | 856 | 856 |
| | N | AGTATTCGGTGAAGCACGA CGCGTATGAACTGAGGTTGT CCAGCTCATAGGATTCCGAGA | 94° 1 min, 58° 1 min, 72° 1 min+ext. 3 sec./ciclo 72° 10 min, 4° > | 35 1 | 1,0 mM | 574 | 574 |
| U89/90 | P | AGATACCACCGTGAAGAGA | 94° 5 min | 1 | 1,5 mM | 485 | 402 |
| | N | CCAGAGGAAGCACCCTAAT AAGAAGGAGCTTCCCTCGGAT TGCAGGCACTAATGGACTGA | 94° 1 min, 58° 1 min, 72° 1 min+ext. 3 sec./ciclo 72° 10 min, 4° > | 35 1 | 2,0 mM | 140 | 57 |

P = prima reazione, N = nested

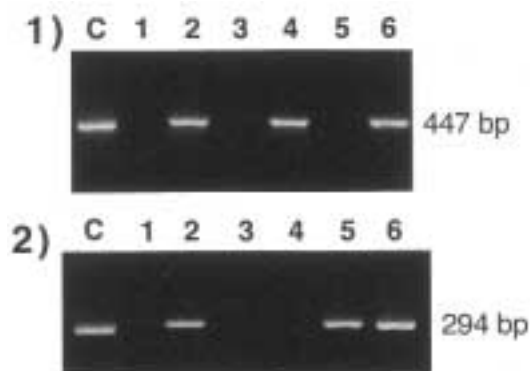
zione del gene *UreC* di *H. pylori* è stata condotta come descritto (20).

Durante le diverse analisi condotte, è stata prestata particolare attenzione per evitare la contaminazione dei campioni, dedicando specifiche stanze alle diverse fasi del lavoro: l'estrazione degli acidi nucleici, la preparazione delle miscele di PCR e la rivelazione degli amplificati sono sempre state eseguite nelle aree designate. Ogni area è stata dotata di materiale (pipette, puntali con filtro incorporato, materiale monouso) ed apparecchiature ad essa specificamente destinati. La rivelazione degli amplificati è stata eseguita mediante elettroforesi su gel d'agarosio (1-2%) o gel di poliacrilamide (4%). Il DNA al termine della corsa elettroforetica è stato visualizzato mediante colorazione del gel con bromuro di etidio e successiva illuminazione con raggi U.V.

Risultati

Il DNA estratto da biopsie di mucosa gastrica prelevate per via endoscopica da 50 pazienti affetti da gastrite cronica istologicamente documentata, è stato analizzato per la presenza del DNA di HHV-7 e di *H. pylori*. L'inclusione di controlli negativi rappresentati dalla sola miscela di reazione ed analizzati contemporaneamente ai campioni clinici, ha consentito di verificare l'assenza di contaminazioni. Tutti i campioni positivi in nested PCR hanno presentato la banda di amplificazione della dimensione attesa, rispettivamente 447 bp per HHV-7 e 294 bp per *H. pylori*. La figura 1 mostra alcuni esempi di campioni

Figura 1. Analisi della presenza di HHV-7 e di *H. pylori* in biopsie di pazienti affetti da gastrite cronica. 1) Risultati di nested PCR relativi al gene U31 di HHV-7; C = controllo positivo rappresentato da DNA genomico estratto da cellule infettate con HHV-7. 2) Risultati di nested PCR relativi al gene *UreC* di *H. pylori*; C = controllo positivo rappresentato da 1 µg di DNA estratto da una biopsia sicuramente positiva ad *H. pylori*.



1-6 = 1 mg di DNA estratto da biopsie di gastrite cronica.

Tabella 2. Presenza di HHV-7 e di *H. pylori* nella gastrite cronica.

| | | HHV-7 | | |
|------------------|---|----------|----------|----------|
| | | + | - | |
| H. pylori | + | 16 (32%) | 4 (8%) | 20 (40%) |
| | - | 23 (46%) | 7 (14%) | 30 (60%) |
| | | 39 (78%) | 11 (22%) | 50 |

positivi per HHV-7 e per *H. pylori*. I risultati dell'amplificazione in nested PCR del gene U31 di HHV-7 e del gene *UreC* di *H. pylori* sono mostrati in Tabella 2. Il DNA di HHV-7 era presente in 39 campioni su 50 analizzati (pari al 78%), mentre sono risultati positivi per la presenza di *H. pylori* 20 campioni (pari al 40%). La presenza di HHV-7 nella gastrite cronica era indipendente dall'infezione sostenuta da *H. pylori*: infatti, 16 campioni (32%) contenevano sequenze di entrambi gli agenti infettanti, ma il DNA di HHV-7 è stato ritrovato anche in 23 (46%) biopsie negative per il batterio.

Studio della presenza di HHV-7 nel sangue periferico di pazienti con gastrite cronica

HHV-7 è un virus linfotropico e sequenze virali vengono frequentemente ritrovate nei linfociti del sangue periferico di donatori sani. La presenza del DNA virale nei campioni di mucosa gastrica potrebbe quindi riflettere semplicemente la presenza di sangue residuo all'interno della biopsia. Per valutare questa possibilità, sono stati analizzati per la presenza del DNA di HHV-7 i PBMCs di ogni paziente affetto da gastrite. Il DNA virale è stato riscontrato più frequentemente nei campioni gastrici rispetto ai campioni di sangue (78% vs. 36%) (Tab. 3). In 17

Tabella 3. Presenza di HHV-7 nella mucosa gastrica e nel sangue periferico di pazienti con gastrite cronica.

| | | HHV-7 nello stomaco | | |
|-----------------------------|---|------------------------|----------|----------|
| | | + | - | |
| HHV-7 nel sangue | + | 17 (34%) | 1 (2%) | 18 (36%) |
| | - | 22 (44%) | 10 (20%) | 32 (64%) |
| | | 39 (78%) | 11 (22%) | 50 |

pazienti (17/50, 34%) le sequenze virali erano presenti sia nel sangue che nella mucosa gastrica, 22 pazienti (22/50, 44%) erano positivi ad HHV-7 nella mucosa ma non nel sangue e soltanto un paziente

(1/50, 2%) aveva il virus nel sangue e non nella mucosa.

Per verificare l'effettiva associazione di HHV-7 con il distretto gastrico ed escludere definitivamente l'ipotesi che la presenza del virus potesse essere dovuta ad una contaminazione del sangue irrorante la mucosa, è stata eseguita una semiquantificazione del carico virale in 13 pazienti positivi ad HHV-7 sia nella mucosa gastrica che nei PBMCs circolanti. L'analisi è stata effettuata analizzando in PCR diluizioni seriali di DNA proveniente dai campioni positivi e confrontando la positività ottenuta in sangue ed in mucosa per ogni paziente. I risultati sono mostrati in Tab. 4. I 13 campioni di sangue esaminati sono risultati positivi ad HHV-7 solo mettendo in reazione un quantitativo di DNA corrispondente a 150.000 (11/13) e a 15.000 cellule (2/13). L'analisi di quantità minori di DNA è risultata nella perdita del segnale positivo. Considerando che la sensibilità della reazione di nested PCR consente di rilevare consistentemente un bersaglio di sole 10 molecole totali (23) si può stimare che, in media, nei PBMCs

si trova circa 1 molecola di DNA virale ogni 15.000 cellule. Il DNA di HHV-7 era invece molto più concentrato nei campioni di mucosa gastrica che, con l'eccezione di due campioni, avevano un carico di DNA virale da 100 a 10.000 volte superiore (Tab. 4).

Studio di follow-up

Per valutare la persistenza del DNA di HHV-7 a livello gastrico, 20 pazienti, tutti positivi sia al virus che ad *H. pylori*, sono stati sottoposti a terapia eradicante mediante antibiotici e ad un secondo esame endoscopico a distanza di un anno dal primo prelievo. Tutti i pazienti hanno dichiarato di non presentare più i sintomi tipici della gastrite. L'analisi dei prelievi biotipici mediante PCR ha mostrato che l'eradicazione del batterio è avvenuta con successo e solo un paziente ha continuato ad essere positivo per *H. pylori*. Nonostante la scomparsa dei sintomi e la negativizzazione della lesione gastrica a livello istologico, 11 biopsie pari al 55% dei campioni esaminati hanno continuato a presentare sequenze di DNA virale (Tab. 5).

Tabella 4. Analisi semiquantitativa di HHV-7 nel sangue periferico e nella mucosa gastrica.

| Paziente | | Numero di cellule analizzate in RT-PCR | | | | |
|----------|---|--|--------|-------|-----|----|
| | | 150.000 | 15.000 | 1.500 | 150 | 15 |
| 1 | M | + | + | + | - | - |
| | S | + | - | - | - | - |
| 2 | M | + | - | - | - | - |
| | S | + | - | - | - | - |
| 3 | M | + | + | + | + | + |
| | S | + | - | - | - | - |
| 4 | M | + | + | + | - | - |
| | S | + | + | - | - | - |
| 5 | M | + | + | + | + | + |
| | S | + | - | - | - | - |
| 6 | M | + | + | + | + | + |
| | S | + | + | - | - | - |
| 7 | M | + | + | + | - | - |
| | S | + | - | - | - | - |
| 8 | M | + | + | - | - | - |
| | S | + | - | - | - | - |
| 9 | M | + | + | + | + | + |
| | S | + | - | - | - | - |
| 10 | M | + | + | + | - | - |
| | S | + | - | - | - | - |
| 11 | M | + | + | + | + | + |
| | S | + | - | - | - | - |
| 12 | M | + | - | - | - | - |
| | S | + | - | - | - | - |
| 13 | M | + | + | + | + | - |
| | S | + | - | - | - | - |

M = MUCOSA, S = SANGUE

Tabella 5. Presenza di HHV-7 e di *H. pylori* nella mucosa gastrica a distanza di un anno.

| | | HHV-7 | | |
|-----------|---|----------|---------|----------|
| | | + | - | |
| H. pylori | + | 0 (0%) | 1 (5%) | 1 (5%) |
| | - | 11 (55%) | 8 (40%) | 19 (95%) |
| | | 11 (55%) | 9 (45%) | 20 |

Analisi dei trascritti di HHV-7

Per analizzare lo stato trascrizionale di HHV-7 a livello gastrico, sono stati estratti simultaneamente il DNA e l'RNA da biopsie eseguite su otto pazienti. Cinque campioni biotipici sono risultati positivi al DNA virale. Si è quindi proceduto su questi campioni all'analisi dell'RNA per determinare se HHV-7 è presente nel distretto gastrico in uno stato trascrizionalmente attivo o se persiste nella mucosa in forma latente. La ricerca dei trascritti è stata effettuata mediante RT-PCR analizzando la trascrizione dei geni U14, U16/17, U31, U42, U89/90. Tutti questi geni appartengono alla classe trascrizionale IE e sono espressi ad alti livelli già durante la fase precocissima dell'infezione virale (23). Per controllare che il materiale ottenuto fosse in effetti amplificabile dopo la retrotrascrizione, i campioni sono stati prima analizzati per la presenza del messaggero della β -actina, un gene trascritto nelle cellule umane. In ogni esperimento di RT-PCR sono stati inseriti dei controlli positivi costituiti da RNA estratto da colture cellulari infettate con HHV-7. I risultati hanno rivelato l'assenza dei trascritti virali (Tab. 6).

Discussione

E' ormai definitivamente riconosciuto che l'infezione da *H. pylori* e l'uso di farmaci anti-infiammatori

sono associati all'insorgenza della gastrite cronica. Tuttavia vi sono pazienti affetti dalla patologia che non mostrano evidenze d'infezione sostenuta dal batterio o non documentano l'uso di farmaci anti-infiammatori. In questi casi è plausibile ipotizzare il coinvolgimento di agenti virali, in particolare alcuni herpesvirus possono essere presenti in campioni gastrici. Il virus di Epstein Barr è stato associato alla genesi del carcinoma epatico (26), (15), ed anche il virus dell'herpes simplex e il citomegalovirus umano sono stati occasionalmente associati alla gastrite. Inoltre in biopsie gastriche effettuate su pazienti affetti dalla Sindrome di Sjogren, sono stati ritrovati gli acidi nucleici di EBV e di HHV-6 (10). Questi dati hanno suggerito di analizzare la presenza di HHV-7 in campioni gastrici. Questo virus è infatti strettamente correlato ad HHV-6 ed è altamente prevalente nella popolazione dove instaura infezioni produttive non necessariamente associate a segni clinici o sintomi specifici. Nell'analisi di PCR condotta su prelievi biotipici eseguiti su pazienti affetti da gastrite cronica, la maggior parte dei campioni (78%, Tab. 2) è risultata positiva al DNA di HHV-7. La presenza del virus si è dimostrata indipendente dall'infezione sostenuta da *H. pylori*: 16 campioni (32%) sono risultati positivi per entrambi gli agenti infettanti, ma HHV-7 è stato ritrovato anche in 23 biopsie (46%) negative per *H. pylori*. L'elevata positività dei campioni potrebbe però essere imputabile ad una contaminazione da parte del sangue circolante nel distretto gastrico. HHV-7 è infatti un virus T-linfotropico e viene normalmente ritrovato nel sangue periferico dei donatori sani. Per escludere questa possibilità, è stato ricercato il DNA di HHV-7 nel sangue periferico dei pazienti di cui è stata analizzata la biopsia gastrica. La mucosa gastrica era più frequentemente positiva al DNA virale rispetto al sangue (Tab. 3). Inoltre, a differenza di quanto rilevato nel sangue, HHV-7 era presente nel distretto gastrico con un alto carico virale (Tab. 4). E' quindi ipotizzabile che il virus sia effettivamente associato alla mucosa piuttosto che al sangue circolante nel

Tabella 6. Analisi dei trascritti di HHV-7 in biopsie di pazienti affetti da gastrite cronica.

| Paziente | DNA HHV-7 | mRNA β -actina | mRNA HHV-7 | | | | |
|----------|-----------|----------------------|------------|--------|-----|-----|--------|
| | | | U14 | U16/17 | U31 | U42 | U89/90 |
| 1 | + | + | - | - | - | - | - |
| 2 | + | + | - | - | - | - | - |
| 3 | + | + | - | - | - | - | - |
| 4 | + | + | - | - | - | - | - |
| 5 | + | + | - | - | - | - | - |

tessuto. Venti pazienti positivi al virus sono stati analizzati nuovamente a distanza di un anno dal primo prelievo biotico. Undici pazienti (55%, Tab. 5) hanno continuato ad albergare sequenze virali nella mucosa senza mostrare però sintomi clinici o alterazioni istologiche. La minore prevalenza virale in questo gruppo di pazienti (55%) è attribuibile al fatto che nel gruppo di follow-up è stata analizzata una sola biopsia, mentre al momento del reclutamento dei pazienti erano stati effettuati tre prelievi biotici da cui estrarre il DNA di HHV-7. Lo studio di follow-up ha dimostrato che la presenza del virus non svolge un ruolo patogenetico diretto nella gastrite cronica. È stato infine analizzato lo stato trascrizionale di HHV-7. Gli studi mediante PCR permettono infatti di evidenziare la presenza del virus, ma non ne chiariscono lo stato replicativo. Questo aspetto è particolarmente importante nel caso degli herpesvirus che, in seguito all'infezione primaria, possono mantenersi in fase latente nell'ospite e periodicamente riattivarsi. È stato dimostrato recentemente che quando HHV-7 è in fase di attiva replicazione, le cellule infettate contengono i trascritti virali relativi a tutti i geni delle tre classi trascrizionali caratteristiche degli herpesvirus (23). Diversamente, quando il virus è latente questi trascritti virali non vengono ritrovati (23). È stata quindi ricercata la presenza dei messaggeri relativi a cinque geni virali espressi ad alti livelli durante le prime fasi dell'infezione. L'assenza dei trascritti ha dimostrato che il virus persiste nel distretto gastrico in uno stato latente.

Anche se i risultati ottenuti non permettono di stabilire un'associazione eziopatogenetica tra HHV-7 e la gastrite cronica, possono essere avanzate alcune importanti osservazioni. Innanzitutto questi risultati confermano l'ipotesi che HHV-7 non deve essere considerato un virus strettamente linfotropico (18). Infatti, la presenza del virus nella mucosa gastrica con prevalenza e carico virale maggiore rispetto al sangue periferico suggerisce che anche il tessuto gastrico rappresenta un sito di latenza virale. Ulteriori studi potranno chiarire se HHV-7 sia in grado di riattivarsi in sede gastrica e se possa essere associato a specifiche patologie. Infine, una considerazione metodologica. In tempi recenti, l'amplificazione mediante PCR è diventata una tecnica essenziale per rilevare la presenza di agenti infettanti e per stabilire una loro possibile associazione con alcune patologie. Nel caso dell'associazione fra HHV-7 e la gastrite cronica, i dati di prevalenza e di carico virale ottenuti mediante PCR avrebbero potuto essere interpretati a favore di un'associazione eziologica. Tuttavia, le analisi condotte ricercando i trascritti virali hanno chiaramente dimostrato che il virus era in uno stato latente e, quindi, non direttamente coinvolto nella patologia. È quindi necessario usare molta

cautela prima di trarre delle conclusioni basate solamente sui risultati di PCR. L'analisi della trascrizione mediante RT-PCR permette una chiara distinzione fra infezione latente e attiva e rappresenta pertanto una tecnica di grande utilità nello studio delle associazioni patogenetiche di HHV-7 e, più in generale, di tutti gli herpesvirus.

Conclusioni

Le sequenze di DNA di HHV-7 ritrovate mediante PCR in biopsie di gastrite cronica indicano che il virus stabilisce infezioni persistenti nella mucosa gastrica. L'analisi mediante RT-PCR mostra l'assenza dei trascritti associati alla fase replicativa, suggerendo che HHV-7 persiste in stato di latenza. Pertanto la mucosa gastrica rappresenta un potenziale serbatoio di riattivazione virale.

Ulteriori studi potranno chiarire se la presenza o la riattivazione di HHV-7 siano associate a specifiche patologie gastriche.

Ringraziamenti

Le ricerche sono state finanziate dall'Azienda Ospedaliera S. Anna, dall'Università di Ferrara e dall'Istituto Superiore di Sanità.

Bibliografia

1. Bayerdorffer E, Lehn N, Hatz R, Mannes GA, Oertel H, Sauerbruch T, Stolte M. Difference in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body. *Gastroenterol* 102, 1575-1582, 1992.
2. Berneman ZN, Ablashi DV, Li G, Eger-Fletcher M, Reitz MS, Hung CL, Brus I, Komaroff AL, Gallo RC. Human herpesvirus 7 is a T-lymphotrophic virus and is related to, but significantly different from, human herpesvirus 6 and cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10552-10556, 1992.
3. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Inf Dis* 161, 626-633, 1990.
4. Clark DA, Freeland JML, Mackie PLK, Jarrett RF, Onions DE. Prevalence of antibody to human herpesvirus 7 by age. *J Infect Dis* 168, 251-252, 1993.
5. Crowley RW, Secchiero P, Zella D, Cara A, Gallo RC, Lusso P. Interference between human herpesvirus 7 and HIV-1 in mononuclear phagocytes. *J Immunol* 156, 2004-2008, 1996.
6. Di Luca D, Dolcetti R, Mirandola P, De Re V, Secchiero P, Carbone A, Boiocchi M, Cassai E. Human Herpesvirus 6: a survey of presence and variant distribution in normal peripheral blood lymphocytes and lymphoproliferative disorders. *J Inf Dis* 170, 211-215, 1994.

7. Di Luca D, Mirandola P, Ravaioli T, Dolcetti R, Friggatti A, Bovenzi P, Sighinolfi L, Monini P, Cassai E. HHV-6 and HHV-7 in salivary glands and shedding in saliva of healthy and HIV positive individuals. *J Med Virol* 45, 462-468, 1995a.
8. Di Luca D, Zorzenon M, Mirandola P, Colle R, Botta G, Cassai E. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 in chronic fatigue syndrome. *J Clin Microbiol* 33, 1660-1616, 1995b.
9. Drago F, Ranieri E, Malaguti F, Losi E, Reboria A. Human Herpesvirus 7 in pityriasis rosea. *Lancet* 349, 1367-1368, 1997.
10. Ferraccioli GF, Sorrentino D, De Vita S, Casatta L, Avellini C, Dolcetti R, Di Luca D, Beltrami CA, Boiocchi M, Bartoli E. B cell clonality in gastric lymphoid tissues of patients with Sjogren's syndrome. *Ann Reum Dis* 55, 311-316, 1996.
11. Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, Katsafanas G, Roffman E, Danovich RM, June CH. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 748-752, 1990.
12. Frenkel N, Roffman E. 1996. Human herpesvirus 7. In: Fields BM, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*, 3rd ed. New York: Lippincott-Raven. p 2609-2622.
13. Fujisaki H, Tanaka-Taya K, Tanabe H, Hara T, Miyoshi H, Okada S, Yamanishi K. Detection of human herpesvirus 7 (HHV-7) DNA in breast milk by polymerase chain reaction and prevalence of HHV-7 antibody in breast-fed and bottle-fed children. *J Med Virol* 56, 275-279, 1998.
14. Gautheret-Dejean A, Aubin JT, Poirel L, Huraux JM, Nicolas JC, Rozenbaum W, Agut H. Detection of human Betaherpesvirus in saliva and urine from immunocompromised and immunocompetent subjects. *J Clin Microbiol* 35, 1600-1603, 1997.
15. Herrera-Goepfert R, Reyes E, Hernandez-Avila M, Mohar A, Shinkura R, Fujiyama C, Akiba S, Eizuru Y, Harada Y, Tokunaga M. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Mexico: analysis of 135 consecutive gastrectomies in two hospitals. *Mod Pathol* 12, 873-878, 1999.
16. Katsafanas GC, Schirmer LS, Frenkel N. In vitro activation of human herpesvirus 6 and 7 from latency. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 9788-9792, 1996.
17. Kempf W, Adams V, Kleinhans M, Burg G, Panizzon RG, Campadelli-Fiume G, Nestle FO. Pityriasis rosea is not associated with human herpesvirus 7. *Arch Dermatol* 135, 1070-1072, 1999.
18. Kempf W, Adams V, Mirandola P, Menotti L, Di Luca D, Wey N, Muller B, Campadelli-Fiume G. Persistence of human herpesvirus 7 (HHV-7) in normal tissues detected by expression of a structural antigen. *J Inf Dis* 178, 841-845, 1998.
19. Kidd IM, Clark DA, Ait-Khaled M, Griffiths PD, Emery VC. Measurement of human herpesvirus 7 load in peripheral blood and saliva of healthy subjects by quantitative polymerase chain reaction. *J Inf Dis* 174, 396-401, 1996.
20. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, Glupczynski Y. Diagnosis of Helicobacter pylori infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 33, 2752-2756, 1995.
21. Lusso P, Secchiero P, Crowley RW, Garzino-Demo A, Berneman ZN, Gallo RC. CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: interference with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 3872-3876, 1994.
22. Megaw AG, Rapaport D, Avidor B, Frenkel N, Davison AJ. The DNA sequence of the RK strain of human herpesvirus 7. *Virology* 25, 119-132, 1998.
23. Menegazzi P, Galvan M, Rotola A, Ravaioli T, Gonelli A, Cassai E, Di Luca D. Temporal mapping of transcripts in human herpesvirus 7. *J Gen Virol* 80, 2705-2712, 1999.
24. Nicholas J. Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus 7. *J Virol* 70, 5975-5989, 1996.
25. Okuno T, Oishi H, Hayashi K, Nonogaki M, Tanaka K, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 and 7 in cervixes of pregnant women. *J Clin Microbiol* 33, 1968-1970, 1995.
26. Pagano JS. Epstein-Barr virus: the first human tumor virus and its role in cancer. *Proc Assoc Am Physicians* 111, 573-580, 1999.
27. Portolani M, Cermelli C, Mirandola P, Di Luca D. Isolation of human herpesvirus 7 from an infant with febrile syndrome. *J Med Virol* 45, 282-283, 1995.
28. Talley NJ, Vakil N, Ballard ED, Fennerty MB. Absence of benefit of eradicating Helicobacter pylori in patients with nonulcer dyspepsia. *New Engl J Med* 341, 1106-1111, 1999.
29. Tanaka K, Kondo T, Torigoe S, Okada S, Mukai T, Yamanishi K. Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J Pediatr* 125, 1-5, 1994.
30. Torigoe S, Koide W, Yamada M, Miyashiro E, Tanaka-Taya K, Yamanishi K. Human herpesvirus 7 infection associated with central nervous system manifestation. *J Pediatr* 129, 301-305, 1996.
31. Valle J, Seppala K, Sipponen P, Kosunen T. Disappearance of gastritis after eradication of Helicobacter pylori. A Morphometric study. *Scand J Gastroenterol* 26, 1057-1065, 1991.
32. Wyatt LS, Frenkel N. Human herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. *J Virol* 66, 3206-3209, 1992.
33. Wyatt LS, Rodriguez WS, Balachandran N, Frenkel N. Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults. *J Virol* 65, 6260-6265, 1991.
34. Walther W, Stein U, Eder C. RNA analysis using miniprep RNA in reverse transcription PCR. *BioTechniques* 17, 674-675, 1994.

Diagnosi delle infezioni delle vie urinarie mediante quantificazione della batteriuria e della leucocituria con un citometro a flusso

S. Valverde, F. Antico, G. Gessoni, A. Giacomini, M. Salvadego, F. Manoni

Regione Veneto, ASL 14, Dipartimento di Patologia Clinica, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Chioggia

Abstract. Background: A large numbers of screening test for rapid diagnosis of UTI were suggested in the Clinical Laboratory but every of these supposed questions other than showed solutions. So the ideal screening test for diagnosis of UTI is until now not available. Aim of this study is to evaluate the feasibility of a screening for rapid diagnosis of UTI by using a second generation flow cytometer. The authors evaluated the analytical performance of the Sysmex UF-100 cytometer versus the diagnosis of UTI supported by laboratory data coming from urine culture, microscopic examination, routine chemical analysis, and clinical data.

Materials and Methods: We considered 2010 consecutive subjects, age between 18 and 78, 870 males and 1140 females, whose recently collected urine samples were submitted for microbiological examination to our Laboratory. The majority (90.2%) of the samples was voided urine specimens collected by using the midstream technique. The samples were collected in sterile containers and a 12 mL aliquot was transferred into test tubes and analysed within one hour. Each sample was submitted to microbiological evaluation (culture + RAA), dipstick tests, UF-100 examination and microscopic observation. These Laboratory results were considered together clinical data and patient's characteristics to obtain a final diagnosis of UTI. The analytical performance of the Laboratory tests was obtained by using this diagnosis as standard.

Results: Of the considered 2010 subjects in 529 (26.32%) we obtained a clinical diagnosis of UTI. The UF-100 based screening give these results SE=0.94, SP=0.93, PPV=0.83, NPV=0.98, CCI=0.93.

Conclusions: In our experience the results of the UF-100 based screening are comparable to data obtained from culture examination based on the simple evaluation of bacterial growth on CLED agar (cut-off 100.000 UFC/mL). The classical culture method needs of 24 hours for a results indeed the UF-100 based screening give us a results in few minutes with obvious benefit for patients and physicians. Moreover the quantification of bacteriuria and pyuria, used in this study as screening test for UTI, is not an new further time and labour expensive test in the to introduce in the Clinical Laboratory practice with corresponding costs, but it is a by-product of the examination of the corpuscle portion of urine by using a flow cytometer.

Introduzione

Le principali manifestazioni cliniche delle infezioni acute delle vie urinarie (IVU) nei pazienti adulti sono la disuria con pollachiuria e stranguria eventualmente associate a febbre, senso di peso sopra pubico, ematuria etc. I principali segni rilevabili dal Laboratorio di Patologia Clinica sono la batteriuria e la piuria, di norma è necessario condurre un esame microbiologico delle urine sia per evidenziare, quantificare ed identificare l'agente eziologico, sia per studiarne il profilo di sensibilità ai farmaci antibatterici (1). Per la diagnosi di laboratorio delle IVU è di importanza critica la definizione di cosa si intenda per

batteriuria e/o piuria significative. Per quanto attiene la batteriuria i criteri stabili da Kass oltre 40 anni fa sembrano ancora validi ed è ampiamente accettato il criterio di considerare significativa di IVU una batteriuria superiore alle 100.000 unità formanti colonie /mL (UFC/mL) (2,3). Per quanto attiene la leucocituria il valore soglia non è ancora ben stabilito poiché la quantificazione microscopica dei leucociti urinari manca ancora di una adeguata standardizzazione, si può comunque ritenere che la presenza di più di 5-10 leucociti per campo ad alto ingrandimento (HPF) possa essere considerata significativa (3). Nella pratica del Laboratorio Clinico, sono stati proposti, nel corso degli anni, numerosi test per la dia-