

Linea di ricerca: **Obiettivo 4.** I nuovi virus delle epatiti: metodi di studio e di riconoscimento

Titolo della ricerca: Ruolo eziopatogenetico di Parvovirus B19 nell'insorgenza di epatiti ad eziologia sconosciuta.

Responsabile scientifico: Zerbini Marialuisa, Professore Associato di Microbiologia

Struttura di appartenenza: Sezione di MICROBIOLOGIA, Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale, Università degli Studi di Bologna

Collaboratori alla ricerca: Musiani Monica, Prof. Associato di Microbiologia
Gentilomi Giovanna, Ricercatore confermato
Gallinella Giorgio, specialista in Microbiol. e Virol
Venturoli Simona, Dottoranda
Manaresi Elisabetta, Dottoranda

M. L. Zerbini

RIASSUNTO

L'infezione da Parvovirus B19 è molto diffusa in natura, il virus viene trasmesso attraverso secrezioni respiratorie, il sangue ed emoderivati. Numerose patologie sono state ormai definitivamente associate all'infezione, ma nuove evidenze indicano un possibile ruolo patogenetico di Parvovirus B19 in manifestazioni cliniche quali: vasculiti, epatiti, malattie autoimmuni e processi infiammatori immuno-mediati.

Poichè esiste una quota di epatiti croniche, a verosimile trasmissione parenterale, non attribuibile a virus classicamente epatitici, definita nonA-nonG, e inoltre malattie auto-immuni sono frequentemente associate a epatiti croniche HCV-correlate, o rappresentano un esempio di patologia epatica ad eziologia ignota, si ritiene opportuno **valutare il ruolo patogenetico di Parvovirus B19 nell'insorgeza di epatiti ad eziologia sconosciuta, autoimmuni e non, e valutare inoltre la possibilità che l'infezione da B19 possa innescare o modificare il corso di malattie autoimmuni nella coinfezione di pazienti con epatite da HCV.**

PROGRAMMA SCIENTIFICO PARTICOLAREGGIATO

RUOLO EZIOPATOGENETICO DI PARVOVIRUS B19 NELL'INSORGENZA DI EPATITI AD EZIOLOGIA SCONOSCIUTA

PROBLEMA GENERALE

L'infezione da **Parvovirus B19** è molto diffusa in natura, circa il 60-70 % della popolazione adulta presenta anticorpi (1, 2). Parvovirus B19 viene in genere trasmesso attraverso secrezioni respiratorie, ma è stata dimostrata anche la trasmissione attraverso il sangue ed emoderivati. Nella maggior parte dei casi l'infezione si manifesta come una malattia lieve di tipo influenzale o decorre a livello subclinico tuttavia, dalla scoperta di Parvovirus B19 nel 1975, l'infezione è stata ritrovata associata a numerose manifestazioni cliniche quali: L'Eritema infettivo, Artropatie post-infettive, Idrope fetale, Crisi aplastiche nel paziente con anemie emolitiche, Crisi aplastiche e Anemie croniche nel paziente immunodepresso (2).

Più recentemente diverse osservazioni, hanno associato l'infezione da B19 a vasculiti (3, 4, 5), a peritoniti da meconio in feti idropici (6, 7, 8, 9), a miocarditi, a epatiti (10), a malattie autoimmuni e a processi infiammatori immuno-mediati (10).

Nell'infezione acuta il virus infetta e lisa i precursori eritroidi a livello midollare e determina un arresto temporaneo dell'eritropoiesi (2). Tuttavia **studi recenti hanno dimostrato che Parvovirus B19 può restare sequestrato in alcuni tessuti** e dare infezioni persistenti del midollo(11). La persistenza del DNA di Parvovirus B19 è stata dimostrata inoltre in cellule della membrana sinoviale, sia in individui sintomatici, sia in soggetti asintomatici(12).

Poichè esiste una quota di epatiti croniche, a verosimile trasmissione parenterale, non attribuibile a virus classicamente epatitici, definita nonA-nonG, e inoltre malattie auto-immuni sono frequentemente associate a epatiti croniche HCV-correlate, o rappresentano un esempio di patologia epatica ad eziologia ignota, si ritiene opportuno valutare il ruolo patogenetico di **Parvovirus B19 nell'insorgeza di epatiti ad eziologia sconosciuta, autoimmuni e non, e valutare inoltre la possibilità che l'infezione da B19 possa innescare o modificare il corso di malattie autoimmuni nella coinfezione di pazienti con epatite da HCV.**

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI CITATI

- 1)Cohen BJ, Buckley MM: The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. *J.Med. Microbiol.* 25, 151, 1988.
- 2)Anderson LJ: Role of parvovirus B19 in human disease. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 6, 711, 1987.
- 3)Finkel, Th., Torok, TJ., Ferguson, PJ. et al. (1994). Chronic parvovirus B19 infection and systemic necrotizing vasculitis: opportunistic infection or aetiological agent? *Lancet.* 348, 1255-58.
- 4)Katz, V.L., McCoy, M.C., Kuller, J.A., Hansen, W.F.(1996). An association between fetal parvovirus B19 infection and fetal anomalies: a report of two cases. *Am. J. of Perinat.*, 13, 43-5.
- 5)Nigro, G., Zerbini, M., Krzysztofiak, A., Gentilomi, G., Porcaro, M.A., Mango, T., Musiani M.(1994). Active or recent parvovirus B19 infection in children with Kawasaki disease. *Lancet.* 343, 1260-1261.
- 6)Knott, PD., Welply, GAC., Anderson, MJ.(1984). Serologically proved intrauterine infection with parvovirus.*BMJ.* 289, 1660.
- 7)Bernard, JD., Berrebi, A., Sarramon, Mf., et al.(1991). Infection materno-foetale à parvovirus human B19.*J.Obstet.Biol. Reprod.* 20, 855-9
- 8)Bloom, MC., Rolland, M., Bernard, JD., Fournie, A., Berrebi, A., Regnier, C.(1990). Infection materno-foetale à parvovirus associée a une peritonite méconiale antenatale. *Arch.Fr.Pediatr.* 47, 437-39.

9)Zerbini, M., Musiani, M., Gentilomi, G., Venturoli, S., Gallinella, G., Gibellini,D., Morandi, R., Guerra, B., Bovicelli, L., La Placa M.(1993). Symptomatic parvovirus B19 infection of one fetus in a twin pregnancy.Clin Infect. Dis.17, 262-63.

10)Torok, T.J. Unusual manifestations reported in patients with Parvovirus B19 infection. (1997) In :Human Parvovirus B19. Ed. L.J.Anderson and N.S.Young. Karger.

11)Cassinotti,P., Burtonboy, G., Fopp, M., Siegl, G.(1997). Evidence for persistence of Human Parvovirus B19 DNA in Bone Marrow. J.Med.Virol., 53, 229-232.

12)Soderlund M., von Essen, R., Haapasaari J., Kiistala U., Kiviluoto, O., Hedman, K.(1997). Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with ad without cheonic arthropathy.Lacet 349: 1063-1065.

DESCRIZIONE DEGLI OBIETTIVI DELLA RICERCA

La ricerca si propone di studiare l'eziologia ed il possibile ruolo patogenetico di Parvovirus B19 nelle epatiti non attribuibili a virus classicamente epatitici.

Saranno inseriti nello studio diversi gruppi di pazienti quali: **i)** pazienti con epatiti ad eziologia sconosciuta, autoimmuni e non-autoimmuni, **ii)** pazienti con epatiti HCV-correlate e malattia autoimmune.

Saranno studiati: **i)** la localizzazione del virus in sede epatica, **ii)** l'andamento dell'infezione (acuta o persistente), **iii)** la sieroprevalenza di anticorpi specifici diretti contro le proteine strutturali di Parvovirus B19, **iv)** la presenza di anticorpi specifici diretti contro la proteina non strutturale (NS1) di Parvovirus B19.

La ricerca si articolerà nelle seguenti fasi:

I campioni saranno rappresentati da siero e biopsie epatiche.

Le indagini virologiche sui campioni di siero e biopsie comporteranno:

-ricerca del DNA di Parvovirus umano B19 nei campioni di siero mediante reazione di ibridazione su filtro utilizzando sonde geniche ad RNA da noi prodotte.

-ricerca del DNA di Parvovirus umano B19 mediante reazione di amplificazione genica di tipo "nested" nei campioni di siero e su estratti delle biopsie epatiche.

-quantizzazione del DNA virale mediante saggio di amplificazione genica competitiva e determinazione dei prodotti amplificati mediante metodo immunoenzimatico (PCR-ELISA competitiva).

-ricerca del DNA di Parvovirus B19 mediante reazione di ibridazione "in situ". utilizzando sonde geniche a DNA da noi prodotte.

-nei pazienti con infezione attiva da B19 sarà valutato l'andamento dell'infezione (acuta, persistente o ricorrente) in relazione alla carica virale e alle manifestazioni cliniche.

- **Per lo studio della risposta immune specifica** verranno utilizzati antigeni ricombinanti, da noi espressi in sistemi eucariotici e procariotici, in saggi di western-blot, per la ricerca di anticorpi diretti contro le proteine strutturali di B19 (VP1, VP2) e contro la proteina non strutturale NS1.

L'esame di questo pattern anticorpale dovrebbe permettere di valutare la risposta immune nei confronti di una infezione recente (presenza di anticorpi anti-VP1 e anti-VP2), di una infezione pregressa (anti-VP1), e di una infezione con possibile evoluzione in infezione persistente (anti-NS1).

- Le diverse fasi della ricerca saranno articolate in un periodo di tre anni.

DESCRIZIONE DELLA METODOLOGIA

- Per la **preparazione della sonda a DNA** partendo da un frammento di genoma di Parvovirus B19 clonato in vettore plasmidico ed amplificato in E.coli, si procede all'estrazione e purificazione del frammento di DNA di B19 e quindi alla marcatura con digossigenina mediante metodo del random-primer.

- La sonda così ottenuta viene utilizzata in saggi di **ibridazione in situ per la ricerca del DNA di B19 su sezioni di biopsie epatiche.**

I campioni clinici, allestiti su vetrini pretrattati, sono fissati in paraformaldeide, sottoposti a trattamento con detergenti, quindi con enzimi proteolitici e ribonucleasi. I campioni sono ibridati e la reazione è visualizzata mediante anticorpi anti-digossigenina marcati con fosfatasi alcalina. Opportuni controlli sono introdotti per verificare la sensibilità e la specificità della reazione. In base alla nostra precedente esperienza infatti, l'utilizzo della digossigenina come molecola marcante e la sua visualizzazione con metodo immunoenzimatico consente di conseguire risultati ottimali rispetto ad altri metodi di marcatura radioisotopici e non-radioisotopici, sia per quanto riguarda la specificità della reazione, sia per quanto concerne la sensibilità del saggio ed il suo utilizzo pratico nelle procedure diagnostiche.

- Per la **preparazione delle sonde ad RNA**, le sonde per il B19 sono costruite utilizzando il frammento BamHI-HindIII clonato in pGEM I, il quale contiene i promotori per le RNA polimerasi SP6 e T7. Le sonde ad RNA marcate sono sintetizzate mediante una trascrizione "in vitro" utilizzando RNA polimerasi T7 e SP6 e uridina trifosfato marcata con digossigenina.

- Sonde così ottenute sono utilizzate per **saggi di ibridazione su filtro. I campioni di siero** sono immobilizzati su filtri di nylon, quindi sottoposti a trattamento proteolitico, denaturati e fissati mediante raggi UV. Vengono quindi sottoposti a reazione di preibridazione e quindi di ibridazione utilizzando le sonde ad RNA marcate con digossigenina; l'ibrido è visualizzato mediante reazione colorimetrica, utilizzando anticorpi anti-dig marcati con fosfatasi alcalina.

- **Ricerca del genoma di B19 nei campioni di siero mediante "nested" PCR.** A questo scopo vengono utilizzate due coppie di primers, le une interne alle altre, in grado di amplificare una sequenza di 104 bp appartenente ad una regione del genoma di B19 che codifica per le proteine strutturali. Il prodotto amplificato viene identificato su gel di poliacrilamide dopo colorazione con etidio bromuro e mediante dot-blot ibridazione utilizzando come sonda una sequenza nucleotidica di sintesi, interna alla regione amplificata.

- **Il monitoraggio virologico quantitativo nel siero e su estratti di biopsie epatiche** sarà effettuato mediante saggio di amplificazione genica quantitativo basato sulla coamplificazione del bersaglio originale e di un competitore interno. Il competitore è stato costruito sostituendo 21 paia di basi della sequenza originale mediante tecnica di PCR ricombinante e clonato in vettore plasmidico. Queste sequenze (originale e mutata) sono coamplificate mediante PCR con incorporazione diretta di marcante, digossigenina, durante la stessa reazione di amplificazione. L'amplificato è quindi ibridato mediante sonde specifiche biotinilate e l'ibrido biotinilato viene catturato su pozzetti rivestiti di streptavidina. L'ibrido catturato è rivelato mediante reazione immunoenzimatica, utilizzando anticorpi anti-digossigenina coniugati con perossidasi. Il metodo di quantificazione virale è estremamente sensibile e specifico (1-10 genomi virali).

Per lo studio sierologico, le proteine ricombinanti VP1 e VP2 saranno utilizzate in saggi immunoenzimatici per la ricerca di anticorpi specifici, mentre la proteina ricombinante NS1 sarà utilizzata in saggi di western blot.

DESCRIZIONE DEL LAVORO PRECEDENTEMENTE SVOLTO

Il lavoro precedentemente svolto ha riguardato sia la messa a punto di metodi originali ed innovativi per la diagnosi di infezione da parvovirus B19, sia la successiva applicazione di tali saggi per comprendere la patogenesi, l'incidenza e l'evoluzione clinica delle infezioni da B19.

Per permettere la produzione di strumenti per la diagnosi di infezione (sonde di acidi nucleici) e lo studio di epidemiologia molecolare di parvovirus B19 abbiamo messo a punto un metodo di **clonazione** efficiente e stabile di **tutta la sequenza codificante del genoma di B19** partendo da piccole quantità di sieri viremici.

Utilizzando frammenti del genoma di B19 da noi clonati, abbiamo costruito nel nostro laboratorio **sonde a DNA e RNA**, utilizzando il frammento Bam HI- Hind III di DNA di Parvovirus B19 inserito nel vettore pGEM I. **Le sonde a DNA sono state marcate con digossigenina** utilizzando il metodo del "random primed DNA". Utilizzando le nostre sonde marcate con digossigenina abbiamo messo a punto **un saggio di ibridazione su filtro con rivelazione colorimetrica e chemiluminescente per la ricerca di DNA di Parvovirus B 19** in campioni di siero. Nel nostro lavoro le sonde sono state rivelate immunoenzimaticamente mediante frammenti Fab anti digossigenina coniugati con fosfatasi alcalina.

Poiché l'infezione da B19 può decorrere come **infezione persistente o ricorrente** a basso titolo virale, abbiamo messo a punto una tecnica di **nested PCR**. Mediante tale tecnica abbiamo potuto ritrovare la presenza di DNA di B19 a bassissimo titolo virale, non riscontrabile con altre tecniche di ibridazione degli acidi nucleici. La tecnica di nested PCR permette dunque di valutare nel tempo l'andamento di tali infezioni persistenti. Sempre allo scopo di poter identificare eventuali stati di bassa replicazione virale e **localizzare in vivo la sede di replicazione di B19**, abbiamo messo a punto una tecnica di ibridazione in situ per **ricercare direttamente il DNA di B19 nelle cellule infette**. Il saggio da noi messo a punto si è rivelato altamente specifico e sensibile e dunque un ottimo test per studiare il possibile ruolo patogenetico dell'infezione da B19.

- **Il monitoraggio virologico quantitativo** è stato effettuato mediante saggio di amplificazione genica quantitativo basato sulla coamplificazione del bersaglio originale e di un competitore interno. Il competitore è stato costruito sostituendo 21 paia di basi della sequenza originale mediante tecnica di PCR ricombinante. Questa prevede l'utilizzo di due primer interni divergenti e

complementari, recanti la sequenza mutata all'estremo 3', e di due primer esterni contenenti siti di riconoscimento per endonucleasi di restrizione. Gli amplificati così ottenuti sono stati clonati in vettore plasmidico. Queste sequenze (originale e mutata) sono coamplificate mediante PCR con incorporazione diretta di marcante, digossigenina, durante la stessa reazione di amplificazione. L'amplificato è quindi ibridato mediante sonde specifiche biotilate e l'ibrido biotilato viene catturato su pozzetti rivestiti di streptavidina. L'ibrido catturato è rivelato mediante reazione immunoenzimatica, utilizzando anticorpi anti-digossigenina coniugati con perossidasi. Il metodo di quantificazione virale è risultato estremamente sensibile e specifico (1-10 genomi virali).

- **Per lo studio sierologico** l'antigene ricombinante NS1 del B19 è stato prodotto in un sistema di espressione in cellule procariotiche.

Il vettore utilizzato è il pTRXFus, per l'espressione di proteine di fusione in E.coli. Il gene che si intende esprimere è stato posto a valle del gene coficante la tioredoxina.

Sono stati costruiti cloni derivati da pTRXFus inserendo la sequenza genica di B19 codificante per la proteina NS1. Tale sequenza genica è già stata da noi clonata in vettori derivati da pUC18.

I cloni trasformati sono stati selezionati per la resistenza alla ampicillina e la presenza dell'inserito verificata mediante purificazione plasmidica ed analisi elettroforetica. L'espressione della proteina ricombinante è stata indotta in E.coli.

La proteina, la cui produzione è stata verificata mediante SDS PAGE, è stata purificata tramite cromatografia d'affinità e utilizzata per l'allestimento di Western-blot.

I metodi diagnostici da noi messi a punto hanno permesso di valutare un **opportuno protocollo diagnostico** per lo studio delle infezioni da B19 e di studiare un possibile **ruolo patogenetico dell'infezione da B19** in diversi gruppi di pazienti.