

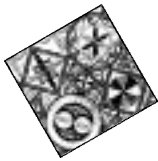
ISSN 0394 3291

Caleidoscopio

Italiano



Roberto Marcante
Luigi Dalla Via



Il virus respiratorio sinciziale



104

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

 **MEDICAL SYSTEMS SpA**

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1996

R. Marcante, L. Dalla Via

Il virus respiratorio sinciziale

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio

Italiano



Roberto Marcante

Luigi Dalla Via¹

*Laboratorio Anallisi Chimico Cliniche e Microbiologia;
Ospedale Civile - Via S. Camillo De'Lellis - 36015 Schio (VI)*

¹ Area Materno-Infantile U.L.S.S. n° 4 "Alto Vicentino"



Il virus respiratorio sinciziale



104

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

 **MEDICAL SYSTEMS SpA**

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1996

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2) Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh, se MS-DOS il testo dovrà essere in formato RTF ed i grafici in formato PC.TIF o PC.Paintbrush.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

Il virus respiratorio sinciziale è sicuramente il più importante agente patogeno delle vie respiratorie dei bambini e la più importante causa di malattia delle basse vie respiratorie nei neonati. Infatti la frequenza più elevata di malattia viene trovata tra 1 e 6 mesi di vita. La frequenza degli attacchi è straordinariamente elevata raggiungendo il 100% tra i neonati in centri quali gli asili nido ed è causa di circa il 25% dei ricoveri per polmonite nei neonati e nei bambini.

Nonostante il fondamentale interesse pediatrico, la re-infezione può verificarsi anche nell'adulto sebbene in forma meno severa.

Il problema della Immunodeficienza acquisita ha sicuramente sollevato in maniera più clamorosa le problematiche di questa infezione e stimolato la ricerca per una soluzione diagnostica e terapeutica rapida dell'infezione.

Questa monografia è sicuramente completa. Dopo aver affrontato i temi legati alla classificazione, l'epidemiologia, la patogenesi, affronta in modo chiaro, completo ed aggiornato il tema della diagnosi valutando attentamente sia le metodiche classiche ritenute un tempo di riferimento, cioè l'isolamento, sia le più recenti ed innovative come la ricerca degli antigeni o degli anticorpi.

Queste ultime si stanno imponendo proprio per la possibilità di poter avere una risposta rapida che può permettere, laddove indicato, di iniziare precocemente la terapia specifica aumentando così le possibilità di successo terapeutico e riducendo i costi generali.

Il dibattito è sicuramente aperto anche perché il "gold standard" della diagnostica, l'isolamento virale, è stato sottoposto a non poche revisioni critiche come viene giustamente segnalato anche in questa monografia.

Sicuramente stiamo comunque aprendo nuove prospettive nella diagnostica anche di questa malattia virale.

Desidero adesso presentare, come nostra tradizione, gli Autori di questa monografia. Il dottor Marcante ha conseguito la laurea in Scienze Biologiche e, successivamente, la Specializzazione in

Microbiologia e Virologia. E' stato assistente biologo presso il Laboratorio Analisi dell'Ospedale di Asiago ed attualmente lavora presso il Laboratorio Analisi dell'Ospedale di Schio, con la funzione di coadiutore biologo, occupandosi prevalentemente dei settori di virologia, sierologia ed immunologia. Iscritto alla Associazione Microbiologi Clinici Italiani è autore di numerose pubblicazioni scientifiche su argomenti di microbiologia ed immunologia con particolare riguardo ai metodi di diagnosi rapida in virologia.

Il dottor Luigi Dalla Via ha conseguito la laurea in Medicina e Chirurgia e successivamente la Specializzazione in Clinica Pediatrica. Ha frequentato la Scuola di Perfezionamento in Neonatologia conseguendo il relativo diploma e quindi quella di Pediatria di Comunità con relativo diploma.

Il dottor Dalla Via è stato Assistente presso la Divisione Pediatrica di Schio, quindi Aiuto C.O. presso la stessa ed attualmente, con la stessa qualifica, Referente dell'Area Materno Infantile, è Autore di alcune interessanti pubblicazioni su temi di microbiologia con riferimento alla popolazione pediatrica.

Sergio Rassu

Introduzione

Il virus respiratorio sinciziale (RSV) è il principale agente responsabile di infezioni respiratorie acute in età pediatrica. Numerosi studi (29, 37, 39, 42) testimoniano infatti della prevalenza delle infezioni da tale virus nelle primissime epoche della vita, in particolare entro i primi 6-12 mesi, spesso sotto forma di improvvise epidemie stagionali. E' stato stimato che negli Stati Uniti sono circa 100.000 i bambini ricoverati in ospedale per infezioni da RSV con un costo globale di 300 milioni di dollari (29).

Per la gravità delle forme morbose causate (bronchioliti, polmoniti) l'RSV può essere considerato l'agente virale con il più alto tasso di morbilità nella primissima infanzia, cui talora si associa anche una certa mortalità, soprattutto fra quei soggetti con patologia non ancora diagnosticata o affetti da cardiopatie, displasia broncopolmonare, fibrosi cistica o immunodepressione (19, 69).

Caratteristica singolare dell'RSV è inoltre quella di essere l'unico agente virale in grado di causare gravi infezioni nelle primissime settimane o mesi di vita quando nel siero del neonato sono ancora presenti anticorpi materni specifici (14).

La possibilità di effettuare una terapia antivirale specifica, almeno nei casi più gravi, ha fatto crescere la necessità e la domanda di una diagnosi rapida delle infezioni da RSV e numerosi sono stati i metodi rapidi messi a punto per la ricerca di questo virus. Il laboratorio di virologia con l'impiego di questi metodi rapidi è oggi in grado in poche ore e in alcuni casi in pochi minuti di fornire al clinico una indicazione di notevole utilità nel decidere ad esempio il tempestivo isolamento del paziente, impedendo così la diffusione del virus a livello ospedaliero, l'inizio di una terapia antivirale ed eventualmente la diminuzione o addirittura la sospensione di una terapia antibiotica.

Classificazione e struttura

Il virus respiratorio sinciziale fu per la prima volta isolato nel 1956 a partire da materiale prelevato dall'apparato respiratorio di una scimmia (55) e solo successivamente fu riconosciuto come agente responsabile di infezioni respiratorie nei bambini. Deve il suo nome sia alla localizzazione delle sue manifestazioni cliniche sia al particolare tipo di crescita in coltura cellulare.

Secondo una recente classificazione viene incluso nella famiglia Paramyxoviridae cui afferisce il genere Pneumovirus comprendente appunto RSV umano, RSV bovino e virus della polmonite murina.

I virioni di RSV sono costituiti da un nucleocapside a simmetria elicoidale avvolto da un involucro lipoproteico che è responsabile del polimorfismo tipico dei virus appartenenti a questa famiglia. Questi si presentano infatti sia in forma rotonda con diametro di 80-500 nm, sia in forme filamentose lunghe fino a 5000 nm (82).

Il diametro del nucleocapside è di 13,5 nm e il passo dell'elica 6,5 nm. Dall'involucro lipoproteico emergono strutture superficiali di 12 nm di lunghezza di natura glicoproteica alla distanza di 10 nm l'una dall'altra.

RSV differisce dagli altri membri della famiglia Paramyxoviridae per la mancanza di attività emoagglutinante e neuraminidasi e per il diametro del nucleocapside che è più piccolo di quello degli altri Paramyxovirus.

L'acido nucleico è un RNA a catena singola, lineare, con polarità negativa di circa 15000 nucleotidi e con peso molecolare di 5×10^6 daltons che codifica per 10 proteine virali con peso molecolare variabile da 160K a 9,5K (fig. 1) (11, 32, 40).

Le sette proteine con dimensioni maggiori (L, G, F, N, P, M e SH) sono proteine strutturali del virione mentre le 3 proteine con peso molecolare inferiore (14K, 11K e 9,5K) sono state descritte come non strutturali (fig. 2) (32).

La proteina di fusione F di 70K e la proteina G di 90K sono glicoproteine di superficie e sembrano avere un ruolo importante, anche se non del tutto chiarito, nell'immunità verso RSV. La proteina F consiste di due frammenti F1 e F2 rispettivamente di 50K e 20K uniti mediante ponti disolfuro e sembra avere una configurazione simile alla proteina di fusione degli altri Paramyxovirus (80). È importante per l'inizio dell'infezione e per il passaggio del virus da cellula a cellula attraverso la fusione del pericapside virale con la membrana della cellula ospite ed è pertanto la proteina responsabile della formazione del caratteristico sincizio evidenziabile in coltura cellulare (80).

Anticorpi monoclonali diretti verso particolari epitopi della proteina F sono in grado di neutralizzare l'infettività virale e di inibire la formazione del sincizio (78).

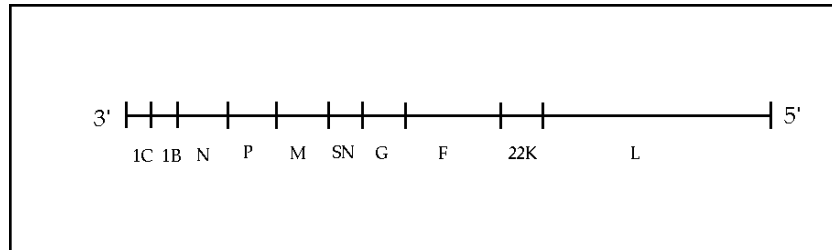


Figura 1. Rappresentazione schematica delle proteine virali codificate dall'RNA genomico di RSV.

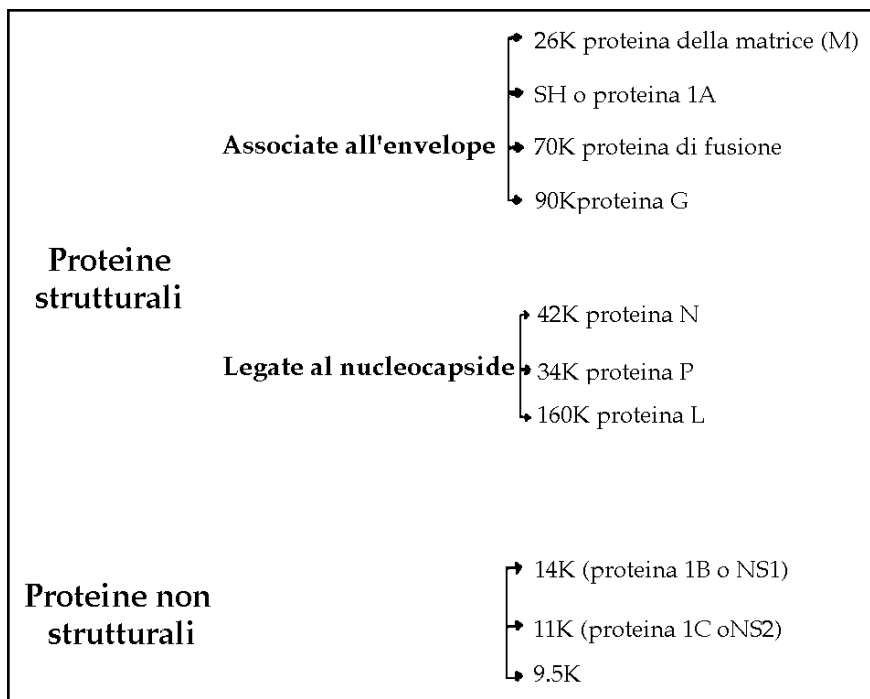


Figura 2. Proteine del virus respiratorio sinciziale.

La glicoproteina G di 90K sembra in grado di riconoscere il recettore cellulare e parrebbe pertanto responsabile dell'adsorbimento del virus alle cellule (45,80). Questa glicoproteina avrebbe quindi un ruolo analogo a quello dell'emoagglutinina degli altri Paramyxovirus anche se come già ricordato precedentemente questa attività è assente in RSV (17).

Anticorpi monoclonali rivolti verso la proteina G neutralizzano l'infettività

di RSV su cellule HEp-2 ma non inibiscono la formazione del sincizio. Inoltre è stato dimostrato che il trasferimento passivo di anticorpi monoclonali anti glicoproteina G protegge il topo dall'infezione da RSV (79).

Oltre alla proteina F e alla proteina G, altri 3 polipeptidi sono associati all'envelope di RSV: la proteina della matrice (proteina M) di 26K che non risulta essere glicosilata (60), la proteina di 22K o proteina M2, situata probabilmente sulla superficie interna del pericapside e la proteina SH (small integral membrane protein, chiamata precedentemente 1A) (60). Quest'ultima proteina si accumula a livello citoplasmatico in almeno 4 forme: due glicosilate di 7,5K e 4,8K e due non glicosilate di 13-15K e di 21-30K (60).

Il nucleocapside risulta costituito, oltre che da RNA genomico, anche dalla proteina N di 42K, principale costituente del capsido e contenente numerosi amminoacidi basici, dalla fosfoproteina P di 34K e dalla proteina L di 160K con probabile attività polimerasica (11, 17, 32).

Le due proteine 1B e 1C (o NS1 e NS2) con peso molecolare rispettivamente di 14K e 11K sono state classificate come proteine non strutturali (32).

Sottotipi di RSV

Recentemente, sulla base di differenti reazioni con anticorpi monoclonali e policlonali, sono state identificate significative variazioni antigeniche fra isolati di RSV e pertanto in base al diverso profilo di reazione questi sono stati separati nei sottotipi A e B (4, 20, 56, 58).

L'analisi delle sequenze nucleotidiche e amminoacidiche dei due ceppi A2 e 18537, prototipi rispettivamente dei sottotipi A e B, ha evidenziato che questi differiscono principalmente nella glicoproteina di superficie G (34, 35).

Questa glicoproteina ha dimostrato all'interno di ciascun sottotipo una omologia nella sequenza nucleotidica superiore al 90% mentre fra i due sottotipi l'omologia è inferiore al 70%. Così pure l'omologia nella sequenza amminoacidica della stessa proteina nei due sottotipi è risultata essere del 53% e la correlazione antigenica solamente di circa il 5% (81).

La proteina F è invece relativamente ben conservata nei due sottotipi sia dal punto di vista antigenico che strutturale. L'omologia della sequenza amminoacidica è del 92% e la correlazione antigenica del 53% tanto che anticorpi specifici per la proteina F crossreagiscono fra i due sottotipi (34).

Epidemiologia

Distribuzione geografica

RSV ha una distribuzione geografica ubiquitaria e provoca infezioni respiratorie in modo caratteristico nei bambini, anche piccolissimi, in qualsiasi zona climatica e con sintomatologia del tutto simile.

Le epidemie insorgono in modo brusco, hanno in genere durata limitata e si verificano ogni anno con andamento regolare e prevedibile (22, 23). Nei climi temperati il periodo epidemico va da dicembre ad aprile con maggiore incidenza fra gennaio e marzo (fig. 3), mentre nei climi tropicali le epidemie solitamente coincidono con il periodo delle piogge (13).

Il periodo di massima attività di RSV è in genere associato ad un aumento dei ricoveri in ospedale di bambini con malattie del tratto respiratorio inferiore così come l'aumento di casi di bronchiolite o di polmonite in bambini non ospedalizzati è predittivo per l'inizio dell'epidemia da RSV (26).

Durante il periodo epidemico più dell'80% dei casi di bronchiolite è sostenuto da RSV e quasi sempre al culmine del periodo epidemico RSV è l'unico patogeno respiratorio presente mentre sono assenti altri patogeni respiratori. A volte possono sovrapporsi episodi epidemici da RSV e da virus influenzale di tipo A ma gli apici delle epidemie non coincidono mai (26).

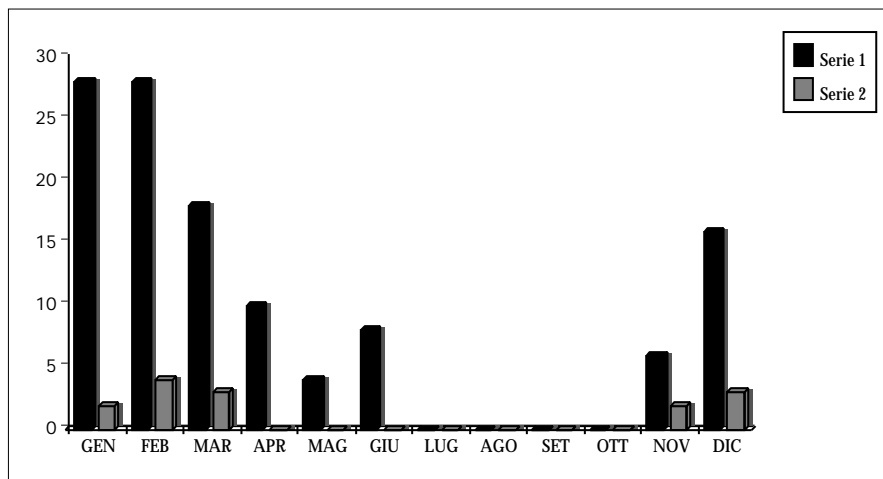


Figura 3. Andamento stagionale delle infezioni da RSV nell'USL n. 4 Alto Vicentino negli anni 1989-1993. (Serie 1: Infezioni basse vie; serie 2: Infezione alte vie).

Pur causando epidemie che si manifestano regolarmente con cadenza annuale, la gravità della malattia respiratoria può variare di anno in anno in relazione alla variabilità dei ceppi di RSV che sono in circolazione (28, 51).

Mediante l'impiego di anticorpi monoclonali e di tecniche di amplificazione genica è stato recentemente possibile differenziare i ceppi di RSV in due tipi principali e in vari sottotipi. Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato come ceppi appartenenti ai due tipi principali possano circolare contemporaneamente, anche se in differenti proporzioni a seconda della stagione e della zona, durante una epidemia (3).

I ceppi del tipo A sono stati quelli più frequentemente isolati in zone degli Stati Uniti e dell'Inghilterra dove per più lungo tempo sono state studiate le epidemie da RSV. In uno studio effettuato a Rochester, New York, i ceppi del tipo B hanno rappresentato più del 75% degli isolati di RSV solamente in due stagioni a distanza di 10 anni una dall'altra (28).

Anche se il rapporto tra ceppi circolanti e gravità della malattia respiratoria deve essere ulteriormente approfondito, secondo alcuni autori i ceppi di tipo A sarebbero associati ad una maggiore gravità della malattia (28, 51).

Modalità di trasmissione

RSV è in grado di diffondere con notevole efficacia sia in ambito familiare sia in ambito ospedaliero. L'efficacia con cui questo virus è in grado di diffondere è in apparente contrasto con la sua labilità nell'ambiente esterno che spesso limita il successo dell'isolamento in colture cellulari nei campioni trasportati o conservati in modo inadeguato.

Per questo motivo il contagio mediante piccole goccioline disperse nell'ambiente attraverso starnuti e colpi di tosse e in grado di percorrere grandi distanze non sembra rappresentare la principale via di diffusione del virus. Queste goccioline contenenti il virus sembrano inoltre avere massima stabilità con una umidità relativa del 60% mentre durante il periodo invernale, con una umidità relativa del 20-30%, sembrano essere relativamente instabili (65).

La diffusione di RSV sembrerebbe pertanto richiedere, come dimostrato anche per i Rhinovirus, un contatto diretto con secrezioni infette (27). Queste secrezioni resterebbero infettanti per un certo periodo anche quando trasferite su vari oggetti quali ad esempio vestiti, fazzoletti o mani di persone che possono pertanto rappresentare una possibile via di trasmissione. Attraverso le mani infette in particolare si può verificare una autoinoculazione mediante sfregamento degli occhi o del naso che costituiscono le più importanti vie di penetrazione del virus (1).

Ipotesi patogenetiche

Il meccanismo patogenetico dell'infezione da RSV suscita da molto tempo un notevole interesse e presenta tuttora aspetti non del tutto chiariti (fig. 4).

La virulenza di RSV è in parte legata alla capacità di provocare infiltrazione peribronchiolare e necrosi dell'epitelio bronchiolare con conseguente ostruzione dei bronchioli soprattutto nei lattanti a causa del piccolo calibro dei bronchioli (87). Non è invece ancora sicuro se RSV abbia un particolare tropismo per l'epitelio bronchiolare anche se alcuni studi hanno evidenziato che la risposta infiammatoria è più intensa a livello dei bronchioli terminali piuttosto che nella parte superiore dell'albero respiratorio. E' stato comunque dimostrato nel furetto che RSV replica con efficienza 100 volte superiore in colture di cellule ottenute da animali di 3 giorni rispetto a quelle ottenute da animali adulti (63). Una tale dipendenza della replicazione virale dall'età non è stata dimostrata nell'uomo anche se clinicamente le infezioni più gravi sono sempre a carico dei bambini più piccoli.

L'azione patogena di RSV non può comunque essere attribuita solamente all'aspetto anatomico del piccolo calibro dei bronchioli nei bambini più piccoli, ma sicuramente anche ad altri fattori (42).

In particolar modo alcune osservazioni farebbero pensare a meccanismi di ordine immunologico per spiegare la maggior gravità di alcune infezioni da RSV: 1) le forme clinicamente più gravi si manifestano generalmente nei pri-

Possibili fattori anatomici

- Piccolo calibro dei bronchioli nei lattanti

Possibili meccanismi immunologici

- Reazione da immunocomplessi (tipo III) nel polmone
- Reazione cellulo-mediata (tipo IV) nel polmone
- Reazione IgE mediata (tipo I)
- Immaturità immunologica del lattante associata alla presenza di anticorpi materni

Possibili fattori legati al virus

- Tropismo per l'epitelio bronchiolare
- Virulenza del ceppo virale
- Elevata carica infettante

Figura 4. Ipotesi patogenetiche.

mi mesi di vita, nel momento in cui i bambini possiedono ancora anticorpi materni. 2) bambini che hanno ricevuto un vaccino anti RSV inattivato con formalina hanno sviluppato malattie più gravi rispetto a bambini non vaccinati. 3) i bambini più piccoli e più severamente colpiti hanno una escrezione del virus più abbondante e prolungata e quindi una persistenza dell'infezione che può provocare una abnorme reazione immunitaria e quindi un più probabile danno (74).

In seguito a queste osservazioni sono state fatte alcune ipotesi di tipo immunologico per spiegare la gravità delle infezioni da RSV nei primi mesi di vita:

1) una reazione da immunocomplessi di tipo III nel polmone tra antigeni virali e anticorpi di classe IgG acquisiti dalla madre o in seguito a vaccinazione (87).

2) una possibile reazione cellulo mediata di tipo IV si può manifestare nel polmone di questi bambini (38).

3) una reazione di tipo I mediata da IgE suggerita anche dall'osservazione che spesso nei bambini con infezione da RSV compaiono anticorpi specifici di classe IgE nel siero e nelle secrezioni e che il livello di queste IgE specifiche per RSV è significativamente più elevato nei bambini con broncospasmo. In questi soggetti era pure aumentata la concentrazione di istamina nelle secrezioni e di IgG4 nel siero (84, 86, 88).

4) immaturità immunologica del bambino associata in parte agli anticorpi materni la cui presenza potrebbe in qualche modo inibire una corretta risposta anticorpale sia qualitativa che quantitativa.

Altri aspetti di tipo non immunologico possono inoltre condizionare la gravità delle infezioni da RSV quali ad esempio la virulenza del ceppo e una elevata carica infettante.

Patologia

Le infezioni da RSV possono essere distinte in infezioni primarie e infezioni recidivanti.

Infezione primaria

Nell'infezione primaria la sintomatologia è rappresentata da a) raffreddore, b) bronchiolite di gravità variabile c) polmonite (37). Solo molto raramente RSV è stato isolato da bambini senza presenza di sintomi clinici (37).

Le manifestazioni al primo contatto con RSV interessano in genere il rinofaringe e sono principalmente rappresentate da rinorrea e congestione nasale accompagnate da febbre. Successivamente, in un periodo tra i 2-5 giorni, può essere coinvolto anche il restante tratto respiratorio con insorgenza di tosse, dispnea e sibili espressione di bronchiolite o polmonite.

Complessivamente si stima che il 40% delle prime infezioni esitano in polmonite di cui solo una piccola porzione può richiedere ricovero ospedaliero. Solamente l'1% delle prime infezioni porterebbe invece a ricovero per bronchiolite. A causa però della diffusione ubiquitaria dell'infezione queste basse percentuali originano in realtà un numero molto elevato di casi di malattia in tutto il mondo costituendo quindi un importante problema sanitario.

Dal 2° al 4° anno di vita l'incidenza delle infezioni da RSV del tratto respiratorio inferiore rimane proporzionalmente uguale anche se, all'aumentare dell'età, diminuisce la gravità dell'infezione e polmonite e bronchiolite si manifestano con frequenza minore, sostituite da tracheobronchite o malattie reattive delle vie respiratorie.

Secondo vari studi la polmonite è la manifestazione clinica più frequente con un rapporto polmonite/bronchiolite che va da 7:1 a 1:1 (22), differenza probabilmente causata dalla mancanza di criteri standardizzati per differenziare clinicamente la bronchiolite dalla polmonite. La laringite è invece la manifestazione con incidenza minore, inferiore al 5%.

In entrambe le patologie infatti dal punto di vista della sintomatologia sono infatti riscontrabili sibili (wheezing) e infiltrati alla radiografia del torace, anche se nella bronchiolite essi sono il risultato di atelettasie piuttosto che di un'inflammazione interstiziale ed essudazione alveolare (22).

Dal punto di vista radiografico la differenziazione è spesso impossibile mentre clinicamente la bronchiolite è definita normalmente dalla presenza dei due segni cardinali che sono wheezing e iperespansione polmonare. Nella polmonite gli infiltrati possono essere accompagnati da rantoli e ronchi con o senza wheezing. Spesso le due sindromi sono associate e la polmonite appare essere un continuo della bronchiolite.

I sintomi sono 1) febbre, che spesso è scomparsa quando il paziente giunge all'osservazione del medico e che pure in bambini ospedalizzati non sempre è presente a temperatura superiore a 38°C. La durata media della fase febbrile è stimata in 6-7 giorni circa, con valori più bassi in genere sotto i 6 mesi che tra i 6-12 mesi di vita. La febbre è più frequentemente presente nelle infezioni primarie rispetto alle reinfezioni in cui compare nel 20-40% dei casi.

2) Tosse, che è sempre presente, particolarmente quando è interessato il tratto respiratorio inferiore. Nella bronchiolite possono essere presenti retrazione della parete toracica e dispnea associate a rantoli e ronchi, nella polmonite riscontrati anche bilateralmente.

La durata della malattia è di circa 7-12 giorni (25). La maggioranza dei soggetti con bronchiolite o polmonite presenta un miglioramento dopo 3-4 giorni e i bambini ricoverati vengono in genere dimessi dopo 4-7 giorni. Il miglioramento clinico non sempre è però accompagnato da scomparsa di infiammazione e nei bambini ospedalizzati l'eliminazione del virus può continuare malgrado la scomparsa della sintomatologia (53).

I quadri radiografici del torace nei bambini ospedalizzati possono presentare aspetti diversi ma il più tipico è quello di una polmonite interstiziale diffusa con iperaereazione polmonare (66). In circa i due terzi dei casi sono presenti infiltrati interstiziali in tutti i lobi mentre nel 20% dei casi l'infiltrato interessa un solo lobo polmonare. L'intrappolamento d'aria è particolarmente indicativo per infezione da RSV e può essere la sola anomalia presente. Non tipica, anche se osservata in molti soggetti, è l'accentuazione della trama peribronchiolare. Addensamenti possono essere rilevati in circa un quarto dei soggetti con coinvolgimento delle basse vie respiratorie ma raramente si presentano da soli, limitandosi generalmente ad una distribuzione subsegmentale. Collasso polmonare e versamento pleurico sono riscontrati raramente. Le anomalie radiografiche tendono a durare più a lungo dei segni e sintomi clinici e le aree di addensamento sono le più lente a dettersi (66).

Infezione del neonato

Nel neonato l'infezione è rara nelle prime 4-5 settimane di vita forse per l'effetto protettivo, anche se solo parziale, degli anticorpi materni acquisiti per via transplacentare (38). L'incidenza della prima infezione è maggiore invece nel secondo mese di vita ed aumenta progressivamente assieme all'opportunità di essere esposti al virus.

I sintomi clinici possono essere variabili e atipici, rappresentati per lo più da sintomi di infezione delle vie respiratorie superiori e tosse con lieve wheezing. I prematuri possono essere particolarmente suscettibili, manifestando oltre la terza settimana di vita una malattia tipica con apnea, scarso appetito, letargia ed irritabilità e con una mortalità fino al 17%.

A volte il sospetto clinico che porta al ricovero in un neonato può essere la setticemia piuttosto che bronchiolite o polmonite. Non è infrequente osservare pure disidratazione da scarso apporto di liquidi e otite media, assieme al coinvolgimento delle basse vie respiratorie. Il segno prevalente in questi casi è l'immobilità della membrana timpanica con essudato sieroso e filante. RSV può esser riscontrato nell'otite media anche assieme a patogeni batterici, segno di possibile ruolo secondario oltre che primario nella patogenesi dell'otite media (10).

Infezioni recidivanti

Nei bambini le infezioni ripetute da RSV sono comuni (7, 30). Vari studi longitudinali hanno dimostrato che fino all'83% dei bambini seguiti può essere reinfettata ogni anno e che l'intervallo tra successive infezioni può coincidere con il periodo tra due epidemie successive ma può anche essere più breve (7).

Le infezioni recidivanti danno in genere una sintomatologia più lieve consistente in tracheobronchite o infezioni del tratto respiratorio superiore anche se non sono comunque da escludere episodi ripetuti di infezione delle basse vie respiratorie.

Molto interessante è stata l'osservazione che l'immunità acquisita dopo una prima infezione non sembra portare nessun miglioramento nel caso di infezione recidivante a distanza di un anno. Solo dopo la terza reinfezione l'immunità acquisita sembra avere un certo ruolo nel limitare la gravità dell'infezione suggerendo che anche l'età oltre ai fattori immunitari può essere importante.

I bambini che hanno infezioni primarie di una gravità tale da richiedere il ricovero raramente hanno seconde o ripetute reinfezioni di analoga gravità a meno che non abbiano malattie di base che li pongano ad alto rischio di complicazioni.

Infezione nell'adulto

La sintomatologia più frequente nell'adulto è il "raffreddore comune" (7). Sintomi di moderata gravità quali ad esempio febbre, malessere, congestione nasale e tosse, con limitazione dell'attività e assenza dal lavoro, sono stati descritti soprattutto in soggetti esposti al contagio come ad esempio genitori o personale infermieristico addetti all'assistenza di bambini malati (77).

Recentemente è stato dimostrato un ruolo di RSV nelle infezioni respiratorie in soggetti anziani soprattutto se ricoverati in case di riposo (2). Le manifestazioni cliniche in questi soggetti possono variare da lievi infezioni del

tratto respiratorio superiore a malattie febbrili similinfluenzali e tracheo-bronchite fino a gravi ed anche fatali polmoniti.

Gravi infezioni da RSV si possono inoltre manifestare in adulti immunodepressi (15). Particolarmente gravi si sono rivelate epidemie in soggetti sottoposti a trapianto di midollo osseo sia per le conseguenze per i soggetti che per i costi per la diagnosi e il controllo dell'infezione.

Infezioni ospedaliere

Solo recentemente l'infezione ospedaliera da RSV è stata riconosciuta come un problema di rilevante interesse da tenere in considerazione soprattutto nel caso di pazienti affetti da gravi patologie (39).

Il rischio di contrarre un' infezione ospedaliera da RSV appare per lo più correlato alla durata dell'ospedalizzazione, tanto che è stato dimostrato che dei bambini ricoverati per una settimana o più, il 45% circa si infetta. Anche la disposizione del reparto e l'età del soggetto sono legati al rischio di infezione: reparti con corsie aperte e bambini di età inferiore all'anno sono substrati più fertili per la diffusione ospedaliera dell'infezione da RSV (43, 59).

L'infezione ospedaliera può riguardare anche il personale addetto all'assistenza che spesso sviluppa una infezione sintomatica e che a sua volta diventa una possibile sorgente di infezione. Il personale ospedaliero non solo può diffondere RSV nell'ambiente ospedaliero infettandosi ed eliminando il virus, ma anche trasportarlo meccanicamente da un soggetto all'altro attraverso secrezioni contaminate (44) .

Diagnosi di laboratorio

La diagnosi di laboratorio delle infezioni da RSV (fig. 5) può essere eseguita in modo diretto mediante isolamento del virus su campioni respiratori sia con tecniche tradizionali sia con tecniche più rapide come la coltura su "shell-vial". E' inoltre possibile evidenziare la presenza di antigeni virali di RSV attraverso tecniche di diagnostica rapida quali l'immunofluorescenza, l'immunoenzimatica o più recentemente metodiche di biologia molecolare.

La sierologia può inoltre essere utilizzata per una diagnosi indiretta mediante titolazione di anticorpi specifici attraverso varie tecniche.

Isolamento del virus. Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni

La scelta del tipo di campione respiratorio da utilizzare è di fondamentale importanza per l'isolamento di RSV. Vari materiali respiratori quali tamponi nasali e faringei, lavaggi nasali e aspirati nasofaringei sono stati utilizzati per l'isolamento di RSV ma secondo vari autori i lavaggi nasali e soprattutto gli aspirati nasofaringei sono risultati essere i più idonei (75). Nella nostra espe-

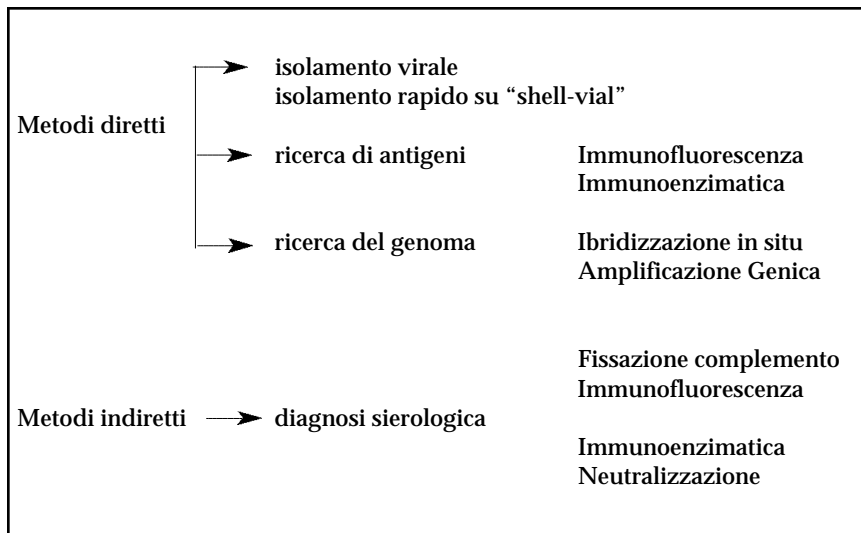


Figura 5. Diagnosi di laboratorio delle infezioni da virus respiratorio sinciziale

rienza l'aspirato nasofaringeo è stato il campione che ha fornito i migliori risultati sia per quanto riguarda l'isolamento del virus sia per i metodi di diagnostica rapida come l'immunofluorescenza in quanto questo tipo di campione, se prelevato correttamente, presenta una elevata cellularità (46, 47).

L'aspirato nasofaringeo si ottiene facilmente mediante estrattori di muco a doppia via (foto 1). Un primo tubicino sterile viene introdotto nel nasofaringe e il materiale è contemporaneamente aspirato mediante l'altro tubicino e raccolto in un piccolo serbatoio a vuoto. In questo modo 0.5-1 ml di aspirato nasofaringeo possono essere raccolti nel contenitore sterile in cui è già presente il terreno di mantenimento.

Hall e Douglas (24) hanno invece messo a punto una tecnica di prelievo mediante lavaggi nasali eseguiti instillando 3-5 ml di PBS sterile nella narice mediante una pera di gomma e aspirando rapidamente con la stessa le secrezioni nasali così ottenute.

I tamponi nasali e faringei, spesso eseguiti in combinazione, possono essere utilizzati soprattutto nei bambini più grandi, ma la loro resa è sicuramente inferiore a quella degli aspirati nasofaringei e dei lavaggi nasali (61).

Qualsiasi sia il campione utilizzato per la ricerca di RSV è comunque di fondamentale importanza che il prelievo venga eseguito il più presto possibile, in fase acuta di malattia. Lo shedding virale di RSV come di altri virus

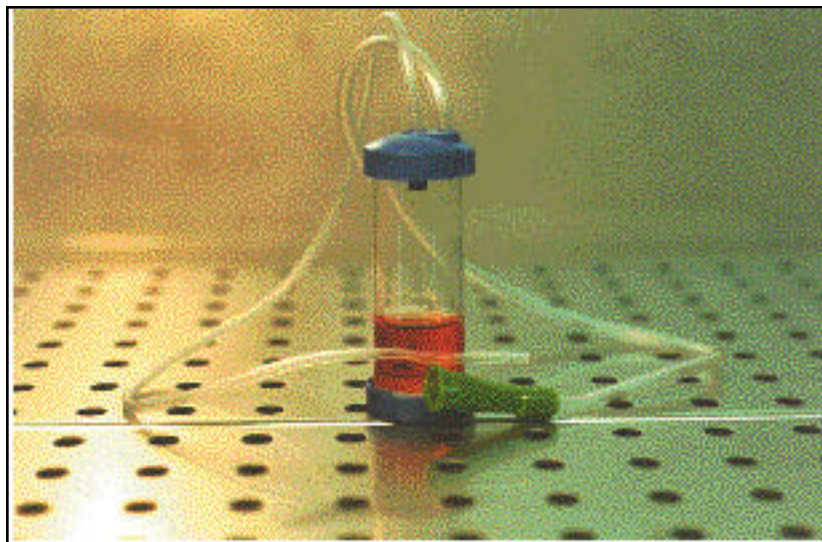


Foto 1. Estrattore di muco con terreno di trasporto per il prelievo di aspirato nasofaringeo.

respiratori è infatti di breve durata e un campione raccolto tardivamente nel corso della malattia potrebbe risultare quindi non più idoneo per l'isolamento.

Dopo alcuni giorni di malattia possono inoltre essere già presenti nelle secrezioni nasali anticorpi specifici con attività neutralizzante in grado di bloccare l'infettività di RSV in colture cellulari (18).

Il trasporto e la conservazione dei campioni sono altri due aspetti molto importanti che possono condizionare notevolmente il successo o meno dell'isolamento (24).

Per il trasporto i campioni respiratori possono essere raccolti in 2-3 ml di Eagle's minimal essential medium (MEM) o di terreno di Leibowitz addizionati con 0.5% di albumina bovina e contenenti 100 U/ml di penicillina e 100 ugr/ml di streptomina.

RSV presenta una notevole instabilità ed è dimostrato che circa il 90% dell'infettività viene perduta dopo conservazione per 2 ore a 24°C (8). Per questo motivo è di fondamentale importanza l'invio immediato dei campioni clinici al laboratorio e il loro trasporto in condizioni ottimali (+4°C).

Una volta in laboratorio è indispensabile procedere rapidamente alla inoculazione dei campioni nelle colture cellulari o, se questo non fosse possibile, al loro congelamento a -80°C. In questo modo l'infettività dei campioni può essere conservata per parecchi mesi.

Scelta della linea cellulare

RSV cresce bene su linee continue di origine umana come le cellule HELA e in particolar modo le cellule HEp-2 che rimane la linea cellulare più suscettibile all'infezione con RSV e più utilizzata per il suo isolamento (61).

Bisogna comunque ricordare che ci possono essere notevoli differenze di sensibilità all'infezione con RSV non solo da parte di ceppi diversi di cellule HEp-2 ma anche da parte di cellule dello stesso ceppo a differenti passaggi.

E' quindi necessario saggiare periodicamente la suscettibilità all'infezione delle cellule HEp-2 in uso con ceppi di RSV (52).

E' dimostrato inoltre che, a certi passaggi, le cellule HEp-2 possono permettere la crescita di RSV senza però sviluppo del tipico effetto citopatico (52).

Altre linee cellulari che possono essere utilizzate, anche se generalmente meno sensibili delle HEp-2, sono il rene primario di scimmia (RhMK) e i fibroblasti diploidi umani (MRC-5, WI38). In uno studio compiuto da Arens e coll. (5) le cellule RhMK sono quelle in cui il CPE nel 90% delle colture positive è comparso più precocemente (7 gg.) contro i 10 gg. delle cellule HEp-2 e i 14 di MRC-5 e WI38. Sui fibroblasti umani inoltre la formazione del caratteristico sincizio è molto meno evidente prevalendo su queste cellule una distruzione del tappeto cellulare.

Isolamento tradizionale

La preparazione delle colture standard può essere fatta facendo sedimentare una sospensione di circa 4×10^4 - 6×10^4 cellule HEp-2 in tubi da 15 mm x 125 mm. Come terreno di crescita può essere utilizzato il MEM di Eagle con aggiunta di glutammina 5mM, necessaria per la formazione del sincizio, 10% di siero fetale bovino e antibiotici (52). Quando le cellule hanno raggiunto un 60-70% di confluenza ciascun tubo viene inoculato con 0.2 ml di campione respiratorio. Dopo un adsorbimento di 1h a 37°C viene aggiunto il terreno di mantenimento, che può avere la stessa composizione del terreno di crescita tranne che per il siero fetale bovino presente al 2%, e il tubo incubato a 37°C (52, 61). La crescita a 37°C è risultata essere equivalente a quella a 33°C ed è preferibile inoculare più tubi per ciascun campione.

I tubi devono essere osservati giornalmente per evidenziare tempestivamente la comparsa dell'effetto citopatico che usualmente sulle cellule HEp-2 può comparire dopo 3-10 giorni in relazione soprattutto alla carica virale presente nel campione. Il cambio del terreno di mantenimento dopo 3-5 giorni di incubazione può accelerare inoltre la comparsa dell'effetto citopatico.

Le colture che dopo 10 giorni di incubazione non hanno manifestato CPE possono essere passate su tubi di cellule fresche ed essere considerate negative dopo altri 10 giorni di incubazione senza comparsa di CPE.

Sebbene la comparsa di sincizi formati da cellule arrotondate fuse in modo irregolare o di cellule giganti (foto 2) sia sufficientemente caratteristica da permettere una presuntiva identificazione di RSV, è comunque utile procedere alla identificazione del virus sia nelle colture che hanno manifestato CPE sia soprattutto in quelle che non lo hanno manifestato dopo 10 giorni di incubazione.

L'identificazione di RSV può essere eseguita con la reazione di fissazione del complemento, con la reazione di neutralizzazione o con la tecnica degli anticorpi fluorescenti (52, 61).

La reazione di fissazione del complemento viene eseguita utilizzando come antigene il supernatante di una coltura con CPE 4+ e una coppia di sieri in fase acuta e convalescente in cui sia stata precedentemente dimostrata una sierconversione o un aumento significativo del titolo anticorpale verso RSV.

La reazione di neutralizzazione, eseguita secondo la metodica classica, prevede la miscelazione di sieri anti RSV ad alto titolo con egual volume di supernatante di una coltura con CPE molto evidente e la semina della miscela su tubi di cellule HEp-2. La presenza di antisiero è in grado di prevenire la comparsa del CPE se l'agente virale presente in coltura è RSV.

La tecnica più semplice e più usata per l'identificazione di RSV in coltura cellulare è comunque l'immunofluorescenza. A questo scopo le cellule della coltura devono essere staccate, risospese in PBS e una goccia depositata in ciascun pozzetto di un vetrino per immunofluorescenza. Dopo essiccamento i

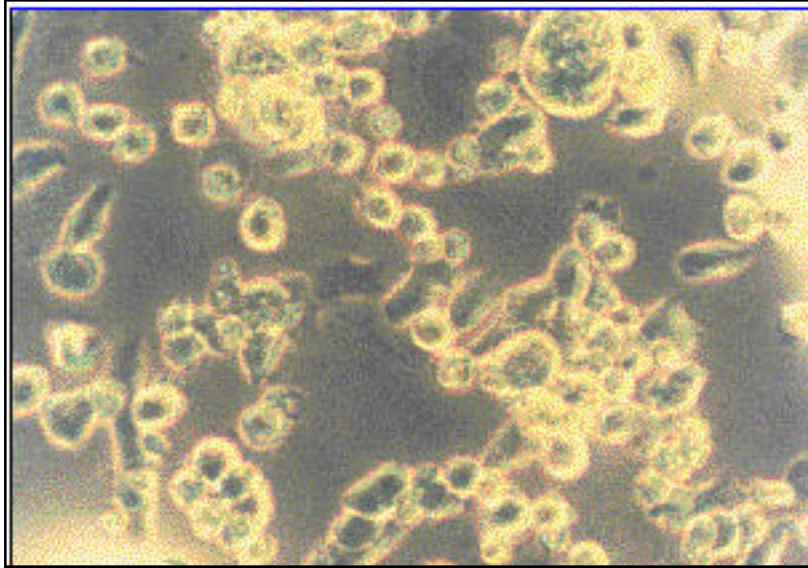


Foto 2. Effetto citopatico di RSV su coltura di cellule HEp-2 dopo 5 giorni di incubazione (20x).

vetrini devono essere fissati in acetone per 10' a 4°C. e colorati con anticorpi anti RSV policlonali o meglio ancora monoclonali. Possono essere utilizzati anticorpi sia direttamente coniugati con fluoresceina che non coniugati.

Isolamento su shell-vial

La tecnica di isolamento rapido su shell-vial è stata originariamente messa a punto da Gleaves e coll. (21) per la ricerca di citomegalovirus ma successivamente è stata applicata anche all'isolamento di altri virus e tra questi molti virus respiratori e in particolar modo RSV (36, 62, 64, 70). Questa tecnica prevede la crescita delle cellule non più su tubi ma su vetrini circolari del diametro di 12 mm contenuti in appositi bicchierini chiamati appunto shell-vial (foto 3), l'inoculazione dei campioni mediante centrifugazione a bassa velocità e la identificazione del virus eventualmente presente mediante reazioni di immunofluorescenza o immunoperossidasi eseguite direttamente sui monostrati cellulari dopo 24-48 ore di incubazione (21).

Nel caso di RSV 0.2 ml di campione respiratorio vengono seminati su monostrati non ancora completamente confluenti (60-70% di confluenza) di cellule HEp-2 fatte crescere appunto su questi vetrini circolari. I monostrati vengono poi inoculati mediante centrifugazione a 700xg per 1 ora a 37°C. Successivamente viene rimosso l'inoculo, sono aggiunti 2 ml di terreno di

mantenimento del tutto analogo a quello utilizzato per l'isolamento tradizionale e le cellule sono incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Dopo 24-48 ore di incubazione, prima ancora quindi della eventuale comparsa del CPE, le cellule vengono fissate in acetone a 4°C per 10' e la presenza di RSV ricercata mediante test di immunofluorescenza sia diretta che indiretta con anticorpi monoclonali.

Gli anticorpi monoclonali utilizzati per il test di immunofluorescenza devono essere specifici per le proteine più conservate di RSV onde evitare false negatività causate da possibili variazioni degli epitopi riconosciuti dai vari anticorpi monoclonali nei diversi ceppi di RSV. Tra i monoclonali i più utilizzati sono quelli rivolti verso la nucleoproteina e la proteina di fusione che abbiamo visto essere le proteine più conservate nei sottotipi A e B. Per migliorare la sensibilità e la specificità nella identificazione di RSV è utile inoltre usare una combinazione di questi due o di altri monoclonali (6).

La tecnica delle shell-vial permette di rilevare la presenza di RSV dopo 24-48 ore, prima quindi della comparsa del CPE, soprattutto nei campioni con elevata carica virale. Nei campioni risultati negativi dopo 24-48 ore è a nostro avviso necessario protrarre l'incubazione fino a 5 giorni e ripetere il test di immunofluorescenza in quanto, se la carica virale del campione è bassa, è possibile avere risultati falsamente negativi dopo 24-48 ore di incubazione.

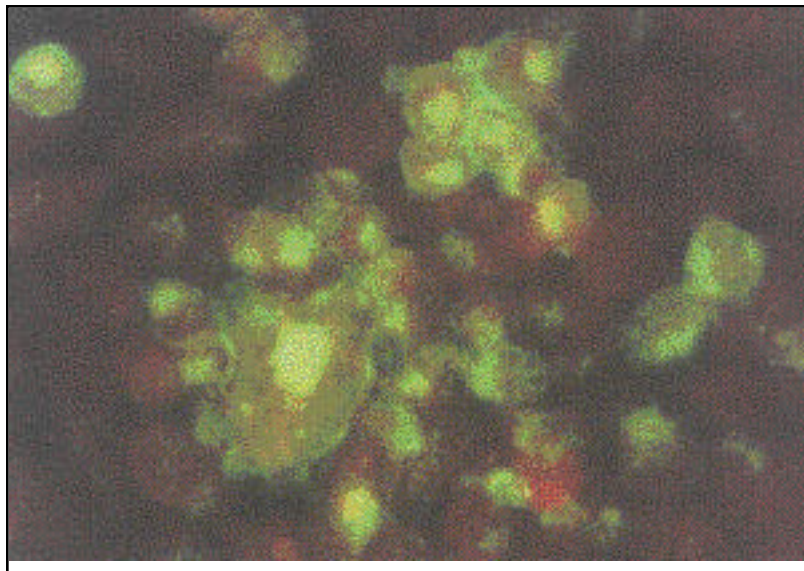


Foto 3. Cultura di cellule HEP-2 positiva per RSV. Identificazione con anticorpo monoclonale fluoresceinato specifico per la nucleoproteina (40x).

Diagnosi rapida mediante ricerca di antigeni di RSV

Come precedentemente ricordato, la possibilità di effettuare una terapia antivirale specifica, almeno nei casi più gravi, ha fatto crescere l'esigenza di una diagnosi più precoce delle infezioni da RSV rispetto a quanto è possibile ottenere con l'impiego delle colture cellulari. Negli ultimi anni quindi sono stati messi a punto diversi metodi rapidi per la ricerca di antigeni di RSV direttamente nelle secrezioni respiratorie che si basano sia su tecniche di immunofluorescenza diretta e indiretta sia su tests immunoenzimatici (18, 33, 41, 47, 48, 49, 50, 72, 73, 83).

I campioni che possono essere utilizzati con i metodi rapidi sono gli stessi descritti a proposito dell'isolamento virale. Deve però essere ricordato che per il test di immunofluorescenza il campione deve avere una elevata cellularità, come ad esempio l'aspirato nasofaringeo, in quanto questo test rivela antigeni associati alle cellule. I tests immunoenzimatici sono in grado di rilevare anche antigeni solubili o particelle virali liberate spontaneamente dalle cellule o per effetto di trattamenti del campione quali sonicazione, lisi, congelamento-scongelo e pertanto il campione non necessariamente deve possedere una elevata cellularità.

Poiché i tests rapidi non richiedono la presenza di virus vitale non è indispensabile trasportare e conservare i campioni con gli stessi accorgimenti che invece sono necessari per l'isolamento di RSV. Le secrezioni respiratorie possono essere raccolte anche in soluzione fisiologica sterile e conservate a +4°C prima di eseguire il test rapido.

Test di immunofluorescenza

Può essere utilizzata sia la tecnica diretta che quella indiretta ma il segreto del successo di questo test sta nella scelta degli anticorpi monoclonali, che devono essere specifici e sensibili, e in un sufficiente numero di cellule esfoliative presenti nel campione (61).

La preparazione del campione viene fatta mediante almeno 2 lavaggi in PBS a pH 7.4 per rimuovere il muco eventualmente presente. Successivamente il sedimento è risospeso in 0.5-1 ml di PBS e alcune gocce depositate su ciascun pozzetto di un vetrino per immunofluorescenza. La sedimentazione delle cellule sul vetrino può essere eseguita in modo ancora migliore mediante citocentrifugazione.

I vetrini vengono lasciati asciugare all'aria e fissati in acetone per 10' a +4°C. Numerosi sono gli anticorpi monoclonali in commercio, sia direttamente coniugati che non coniugati con fluoresceina, che possono essere utilizzati per la ricerca di RSV direttamente da materiale respiratorio.

Prevalentemente questi anticorpi sono rivolti verso la nucleoproteina o la proteina di fusione, ma possono essere utilizzate anche miscele di 2 o più

monoclonali con specificità diverse per aumentare la sensibilità e la specificità del test di immunofluorescenza (6). Pool formati da miscele di differenti anticorpi monoclonali sono inoltre in grado di dare un segnale di fluorescenza più intenso, paragonabile a quello ottenibile con anticorpi policlonali ma con una superiore specificità e quindi con un background di fluorescenza nettamente migliore (6, 87).

La tecnica di colorazione è quella classica: incubazione a 37°C per 30' con l'anticorpo primario fluoresceinato e due lavaggi in PBS di 5' nel caso del test diretto. Ulteriore incubazione di 30' sempre a 37°C con il secondo anticorpo fluoresceinato anti IgG di topo seguita dai due lavaggi nel caso della tecnica indiretta.

La tecnica diretta ha il vantaggio rispetto a quella indiretta di una maggiore rapidità di esecuzione mentre la fluorescenza indiretta presenta una maggiore sensibilità dovuta all'amplificazione del segnale fluorescente. Entrambe assicurano comunque una notevole specificità e sensibilità.

I campioni positivi mostrano (foto 4) una tipica fluorescenza granulare molto intensa a livello citoplasmatico quando l'anticorpo monoclonale impiegato è specifico per la nucleoproteina. L'impiego di anticorpi monoclonali con specificità diverse può portare anche ad un differente quadro fluoroscopico (87).

Il test di fluorescenza per la ricerca di RSV presenta sia aspetti positivi che negativi. Gli aspetti negativi possono essere dovuti al campione, all'operatore o insiti nella metodica stessa. Quelli legati al campione sono ad esempio l'autofluorescenza dovuta in genere ad un eccesso di muco. L'autofluorescenza è in genere facilmente riconosciuta da un osservatore esperto per la particolare colorazione del campione. Esiste poi la possibilità di un legame aspecifico dell'anticorpo con cellule che possiedono il recettore FC per le IgG e anche la perdita dell'antigenicità del preparato per una non adeguata fissazione (61).

I limiti dovuti all'operatore sono legati alla necessità di esperienza nella lettura e alla soggettività della interpretazione dei risultati. Questo aspetto legato all'esperienza dell'operatore può però essere considerato anche un aspetto positivo di questa metodica in quanto assicura una "valutazione critica" del risultato. Un aspetto negativo legato alla metodica è infine la sua scarsa possibilità di automazione.

Caratteristica positiva di questa metodica è la sua sensibilità. E' infatti sufficiente il riscontro in un preparato anche di una sola cellula con la tipica fluorescenza per considerare quel campione come positivo (87). La fluorescenza permette inoltre di correlare la localizzazione della fluorescenza a livello cellulare con la citopatologia del virus.

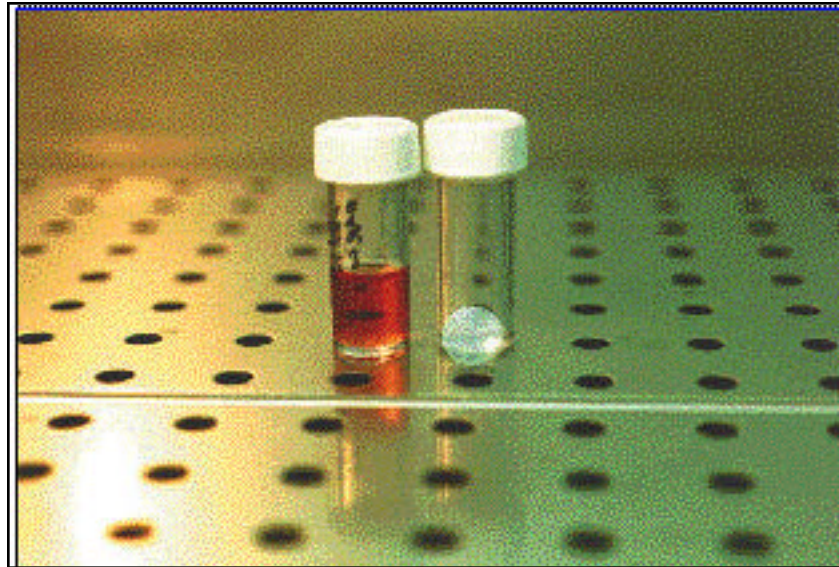


Foto 4. Sistema "Shell-Vial" per l'isolamento rapido di RSV.

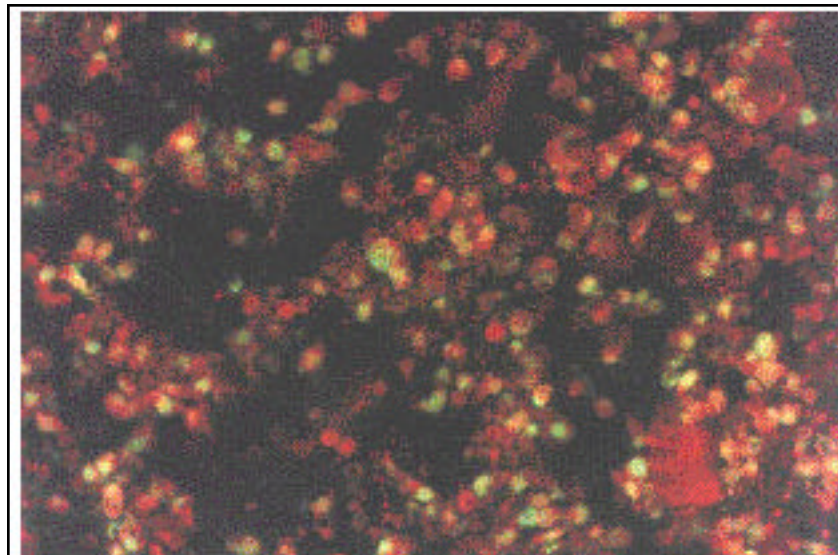


Foto 5. Reazione di immunofluorescenza eseguita direttamente su campione di aspirato nasofaringeo positivo per RSV (40x).

Test immunoenzimatico

Numerosi tests ELISA sono stati recentemente messi a punto per la ricerca di antigeni di RSV direttamente nelle secrezioni respiratorie (9, 41, 47, 71, 72, 73). Questi tests possono impiegare, come per la fluorescenza, sia la tecnica diretta che quella indiretta. In entrambi i casi un anticorpo monoclonale o una miscela di più anticorpi monoclonali specifici per proteine di RSV vengono fatti aderire su un substrato solido costituito da una piastra microtiter in polistirene, da tubi o palline di plastica.

Il campione respiratorio in genere viene aggiunto dopo trattamento con lisante per liberare il virus legato alle cellule.

Nella tecnica diretta, dopo incubazione e vari lavaggi per allontanare il materiale non legato, viene aggiunto un anticorpo monoclonale direttamente coniugato con l'enzima e specifico per un epitopo di RSV diverso da quello riconosciuto dall'anticorpo legato al substrato solido. Segue quindi una ulteriore incubazione, lavaggi e aggiunta dello specifico substrato.

L'ELISA indiretto prevede invece la tecnica del doppio anticorpo il primo dei quali non marcato e il secondo marcato con l'enzima.

Il test ELISA diretto rispetto a quello indiretto ha una maggior rapidità di esecuzione ma presenta maggiori difficoltà nella marcatura degli anticorpi monoclonali. Il test ELISA indiretto ha una maggiore sensibilità dovuta alla maggiore amplificazione del segnale che si ottiene con la tecnica del doppio anticorpo ma necessita l'impiego di due anticorpi monoclonali ottenuti da specie diverse, specifici per due diversi epitopi dell'antigene virale.

Aspetti positivi del test sono una elevata sensibilità, essendo in grado in alcuni casi di rilevare fino a 10 ngr di proteina virale (31), la possibilità di essere eseguito in automazione e quindi l'analisi di un numero elevato di campioni. La lettura dei risultati, basata sul metodo spettrofotometrico, non è inoltre legata a soggettività nell'interpretazione.

La specificità del test ELISA dipende dalla specificità degli anticorpi monoclonali utilizzati che, come per la fluorescenza, sono in genere rivolti verso la nucleoproteina o la proteina di fusione di RSV.

A nostro avviso inoltre il test ELISA non consente all'operatore la possibilità di "intervento critico" nella valutazione dei risultati così come può avvenire per la fluorescenza in quanto la positività dei campioni viene determinata in base al confronto con un valore di cut-off.

Sono inoltre possibili false positività dovute alla presenza di sostanze interferenti non sempre definibili con sicurezza.

Test immunoenzimatico su membrana

Questo test costituisce una particolare applicazione del metodo ELISA in cui il substrato solido su cui avviene la reazione immunoenzimatica è costituito da una membrana di nitrocellulosa (47, 83).

Il campione respiratorio, dopo essere stato trattato con una soluzione lissante, viene fatto filtrare attraverso una membrana di nitrocellulosa con idonea porosità. La filtrazione permette la concentrazione del virus eventualmente presente nel campione sulla superficie della membrana stessa. Dopo un rapido lavaggio viene aggiunto l'anticorpo monoclonale specifico per RSV marcato con l'enzima, seguono una breve incubazione a temperatura ambiente un nuovo lavaggio e l'aggiunta del substrato. La lettura viene fatta visivamente osservando la comparsa di colorazione nella zona di filtrazione del campione.

Vantaggi di questo test sono la notevole rapidità di esecuzione che permette di ottenere un risultato dopo 15-30 minuti ed anche una buona sensibilità e specificità. Possono esserci dubbi interpretativi per la difficoltà di valutare deboli reazioni colorate che si ottengono in campioni con bassa carica virale.

Inoltre una non corretta filtrazione del campione può portare a risultati falsamente positivi così come la necessità di diluire i campioni con elevata cellularità che non filtrano attraverso la membrana può avere come conseguenza una perdita di sensibilità del test con risultati falsamente negativi.

Questo test sembra inoltre avere una maggiore sensibilità nei campioni in cui RSV è presente "legato" a cellule piuttosto che con virus "libero" (83). I migliori risultati anche per questo test si ottengono quindi impiegando campioni con elevata cellularità quali appunto gli aspirati naso faringei.

Sensibilità e specificità dei tests rapidi per la ricerca di antigeni rispetto all'isolamento virale

Una corretta valutazione dei test rapidi per la ricerca di antigeni virali deve necessariamente prevedere il confronto con l'isolamento del virus, che, ove possibile, rimane il "gold standard" con cui tutti i nuovi metodi devono essere confrontati.

Nel caso di RSV il test di immunofluorescenza e il test ELISA sono stati confrontati in numerosi studi sia con l'isolamento tradizionale del virus sia con l'isolamento rapido su shell-vial. Questi lavori (6, 9, 18, 31, 36, 41, 46, 47, 48, 50, 71, 73) hanno evidenziato una buona sensibilità sia della fluorescenza che dei vari tests ELISA commerciali con valori compresi fra l'85% e il 97%. Per quanto riguarda la specificità i valori variano a seconda dei vari autori fra il 72% e il 100%. La apparente bassa specificità riscontrata in alcuni studi è dovuta al fatto che molti campioni positivi in immunofluorescenza ed ELISA erano negativi con il metodo colturale e considerati quindi come falsi positivi.

Per verificare la effettiva specificità dei risultati positivi ottenuti con il test ELISA su campioni negativi in coltura, alcuni autori hanno eseguito su questi campioni un test di "bloccaggio" incubando preventivamente il materiale respiratorio con anticorpi da coniglio anti RSV e ripetendo successivamente il test ELISA (9). Una diminuzione dell'assorbanza superiore al 50% portava

a ritenere quel campione come vero positivo. In questo modo molti campioni considerati inizialmente “falsi positivi” sarebbero in realtà da considerare come “veri positivi” nei quali sarebbe stato l’isolamento virale a fornire risultati falsamente negativi (9).

Se da un lato quindi l’isolamento di RSV in coltura cellulare deve essere considerato il metodo di riferimento è pure vero che questo metodo risente di alcuni fattori che, se non tenuti nella dovuta considerazione, rischiano di limitarne le caratteristiche positive.

Il primo di questi fattori, come già ricordato, è la notevole instabilità di RSV che perde il 90% della infettività dopo conservazione per 24 ore a temperatura ambiente. Un secondo problema riguarda la suscettibilità all’infezione con RSV da parte delle cellule HEp-2 che può variare anche in modo notevole a seconda dei diversi ceppi di cellule. Inoltre durante i passaggi delle cellule HEp-2 la suscettibilità all’infezione può essere periodicamente persa o vi può essere crescita di RSV senza sviluppo del caratteristico effetto citopatico. Altro fattore che può provocare risultati falsamente negativi delle colture è la comparsa di anticorpi specifici con attività neutralizzante nelle secrezioni nasali dopo pochi giorni dall’inizio della malattia.

I tests rapidi possono fornire anche risultati falsamente positivi. Nel caso del test ELISA questo si può verificare soprattutto nei campioni debolmente positivi con valori di assorbanza vicini al cut-off (72). Spesso la ripetizione del test ELISA su questi campioni fornisce risultati negativi ed è pertanto opportuno valutare con prudenza questi risultati e confermare sempre i campioni debolmente positivi con un altro test.

Risultati falsamente positivi nel caso della immunofluorescenza si possono avere per errori nella valutazione del preparato da parte di operatori inesperti. Questi errori possono essere dovuti ad esempio sia al fenomeno della autofluorescenza sia ad un legame aspecifico del coniugato su cellule che esprimono il recettore FC per le IgG e solo l’attenta osservazione da parte di un operatore esperto permette di distinguere questa fluorescenza aspecifica da quella specifica (61).

La valutazione dei test rapidi deve tener conto sia degli aspetti positivi quali la sensibilità, la specificità e soprattutto la notevole rapidità di esecuzione sia della possibilità pur sempre presente di ottenere risultati falsamente positivi o negativi.

E’ molto importante quindi tenere nella dovuta considerazione tutti quei fattori che abbiamo visto possono interferire negativamente sul risultato del test e soprattutto avere sempre la possibilità di confermare i risultati dubbi con l’isolamento di RSV che pur sempre rimane il metodo di riferimento.

L’esecuzione dei tests rapidi dovrebbe quindi secondo noi essere sempre effettuata nel contesto di un laboratorio di microbiologia in cui l’esperienza acquisita attraverso l’esecuzione delle tecniche virologiche classiche può anche permettere una critica valutazione dei risultati.

Diagnosi sierologica

La diagnosi sierologica delle infezioni da RSV può essere eseguita con varie metodiche quali ad esempio la fissazione del complemento, l'immunofluorescenza, il test ELISA o la reazione di neutralizzazione.

La fissazione del complemento è una tecnica poco sensibile e non adatta alla ricerca di anticorpi nei bambini piccoli, proprio la popolazione che invece è più colpita da RSV. In uno studio di Richardson e coll. (67) solo un bambino su 49 con età compresa fra 1 e 3 mesi dimostrò un aumento significativo del titolo anticorpale con questa tecnica durante l'infezione da RSV. Anche se nei bambini più grandi il numero di sier conversionsi individuate con la fissazione del complemento aumenta, questo test viene raramente usato per la diagnosi delle infezioni da RSV in soggetti di qualsiasi età.

L'impiego della fluorescenza, soprattutto con la tecnica della fluorescenza indiretta di membrana su cellule infettate con RSV, ha permesso di aumentare la sensibilità rispetto alla fissazione del complemento (85). Con questa tecnica è stato infatti possibile osservare aumenti significativi del titolo anticorpale nel 75% dei bambini con età compresa tra 1 e 6 mesi e nel 100% dei bambini con più di 6 mesi. L'immunofluorescenza permette inoltre di valutare la presenza di anticorpi di classe IgM quali indicatori di infezione acuta. Purtroppo tali anticorpi vengono riscontrati solo in un numero limitato di casi nei bambini di età inferiore a 3 mesi e in circa il 50% dei bambini con più di 3 mesi al momento dell'infezione primaria (87).

Più recentemente sono stati allestiti vari metodi immunoenzimatici per la titolazione degli anticorpi anti RSV (67). Queste tecniche ELISA possono utilizzare, adesi alla fase solida, sia antigeni non purificati di RSV sia antigeni purificati o parzialmente purificati. I test ELISA con antigeni non purificati forniscono risultati sostanzialmente sovrapponibili a quelli ottenuti con il test di immunofluorescenza. Spesso questi tests evidenziano valori elevati di assorbanza di fondo dovuti all'impiego di antigeni non purificati. Questo inconveniente non si verifica invece nei tests che utilizzano antigeni purificati, con i quali si ottengono anche titoli anticorpali molto più elevati rispetto alla fissazione del complemento.

Anche i tests immunoenzimatici possono evidenziare anticorpi virus specifici di classe IgM ma, come per la fluorescenza, la presenza di questi anticorpi marcatori della fase acuta di malattia è limitata ad una bassa percentuale di casi nei bambini con età inferiore ai 6 mesi (54).

Nei bambini con età superiore ai 12 mesi una elevata percentuale di soggetti presenta invece una risposta anticorpale di tipo IgM che è evidenziabile dopo alcuni giorni dalla comparsa della sintomatologia e persiste per circa tre mesi.

La reazione di neutralizzazione ha buone caratteristiche in termini di sensibilità e specificità rispetto agli altri metodi citati ma la sua applicazione routinaria risulta difficile per la complessità di esecuzione.

Da quanto detto appare evidente che la giovanissima età dei soggetti colpiti da questa infezione limita l'impiego dei tests sierologici a scopo diagnostico. Nei bambini di età inferiore ai 6 mesi con infezione primaria, tutti i tests sierologici, anche se in misura diversa, possono fornire risultati falsamente negativi sia per gli anticorpi di classe IgG che soprattutto per quelli di classe IgM. Se a questo fatto si aggiunge la necessità di ottenere un doppio prelievo di sangue, uno in fase acuta e l'altro in fase di convalescenza della malattia, è secondo noi lecito affermare che l'efficacia della diagnosi sierologica nelle infezioni da RSV è sicuramente inferiore alla ricerca degli antigeni con metodi rapidi o all'isolamento del virus in coltura. La giusta collocazione della sierologia a scopo diagnostico potrebbe quindi essere quella di completamento ai tests diretti sopracitati soprattutto nei bambini con età superiore ai 12 mesi.

Terapia

Il trattamento delle infezioni da RSV è imperniato da molto tempo su una terapia di mantenimento mediante somministrazione di ossigeno ed idratazione per via venosa che sono il cardine di qualsiasi terapia per le infezioni delle basse vie respiratorie (87).

L'impiego di broncodilatatori nei bambini con bronchiolite è ancora controverso. I primi studi non evidenziavano significativi benefici con l'uso di isoprenalina, adrenalina, salbutamolo e albuterolo o teofillina, nell'ipotesi di un'assenza di beta 2 recettori adrenergici nel polmone del lattante. Studi recenti hanno invece evidenziato un effetto benefico dei broncodilatatori in pazienti con bronchiolite anche di età inferiore all'anno.

Va comunque sottolineato che la risposta ai broncodilatatori deve essere attentamente monitorata perché in alcuni pazienti si può verificare un calo della saturazione arteriosa di O₂ (57, 68).

Nessun dato clinico sembra raccomandare l'impiego di corticosteroidi sistemici nel trattamento della bronchiolite da RSV anche se sono stati sperimentati in molti centri nei pazienti ad alto rischio e nella terapia intensiva (87).

Accanto a questi trattamenti aspecifici è attualmente disponibile anche un trattamento specifico che consiste nella somministrazione di ribavirina, un nucleoside sintetico dimostratosi attivo verso molti virus sia a RNA che a DNA. Il meccanismo di azione di questo farmaco rimane tuttora sconosciuto anche se sembra interferire nella sintesi dei messaggeri virali e, nel caso del virus influenzale di tipo A, anche sulla polimerasi virale (87).

La valutazione dell'efficacia della terapia con ribavirina nelle infezioni da RSV non è semplice a causa della molteplicità dei fattori di rischio e della gravità variabile della malattia e la sua utilità è stata oggetto di numerosi studi che hanno avuto anche risultati discordanti. Infatti, accanto a studi che indicano un effetto positivo della ribavirina con miglioramento clinico in diversi pazienti compresi gli adulti e gli immunodepressi, ne esistono altri in cui non è stato dimostrato nessun effetto benefico sulla durata del ricovero ospedaliero, sulla durata della ossigenoterapia, sul ricorso alla ventilazione meccanica o sulla mortalità (12, 16).

Un altro aspetto di controversia è inoltre la sua efficacia in rapporto ai costi elevati e alle obiettive difficoltà di somministrazione. A causa infatti della relativa insolubilità che tende a farla precipitare, la ribavirina deve essere somministrata per aerosol con l'impiego di speciali umidificatori per 18-20 ore al dì per 3-5 giorni (87).

Una certa cautela nell'impiego della ribavirina deve essere inoltre osservata a causa della teratogenicità del farmaco in animali da esperimento (87). La ribavirina ad elevati dosaggi ha inoltre dimostrato avere un effetto immunosoppressivo in animali da esperimento causando atrofia del tessuto linfatico

del timo, milza e linfonodi nel ratto. Questo effetto immunosoppressivo sembra essere presente anche nell'uomo in cui è stata dimostrata una soppressione della risposta umorale almeno per quanto riguarda le immunoglobuline di isotipo IgG, IgA e IgE (87).

Sulla base di queste considerazioni la Società Americana di Pediatria ha stabilito delle linee guida che prevedono l'impiego della ribavirina soltanto nelle infezioni da RSV in bambini con malattie cardiache congenite, displasia broncopolmonare o altre malattie polmonari, sindrome da immunodeficienza congenita od acquisita nonché bambini con infezione di particolare gravità o di età inferiore alle 6 settimane.

La inoculazione o la somministrazione per aerosol di immunoglobuline con elevati livelli di anticorpi neutralizzanti specifici per RSV ha avuto recentemente promettenti risultati nell'animale da esperimento sia dal punto di vista preventivo che terapeutico (14). Le stesse immunoglobuline somministrate a bambini ospedalizzati con infezioni del tratto respiratorio inferiore da RSV sembrano ridurre l'eliminazione del virus e migliorare l'andamento clinico. La figura 6 riassume tutti i possibili interventi terapeutici in corso di infezione da RSV.

Terapia aspecifica	
- di supporto:	ossigeno idratazione per via venosa terapia intensiva e ventilazione meccanica
- broncodilatatori:	isoprenalina adrenalina salbutamolo e albuterolo teofillina
- steroidi	
- antibiotici	di copertura
Terapia specifica	
- ribavirina	per aerosol
- gammaglobuline	per via endovenosa
- vaccino	

Figura 6. Terapia delle infezioni da RSV.

Vaccinazione

Il primo vaccino sperimentato all'inizio degli anni '60 nella prevenzione dell'infezione da RSV era costituito da virus inattivato con formalina. Nonostante questo vaccino producesse una elevata percentuale di sieroconversioni, non solo non forniva una efficace protezione ma sembrava anzi dar luogo ad una malattia di maggiore gravità quando i vaccinati erano successivamente contagiati in modo naturale da RSV (29).

Tentativi successivi sono stati rivolti allo sviluppo di un vaccino vivente attenuato (29) e di vaccini basati sull'impiego di mutanti del virus sensibili al calore con risultati però non soddisfacenti nel secondo caso a causa della instabilità genetica del virus mutante e alla sua eliminazione da parte dei soggetti vaccinati.

Molte speranze sono state recentemente riposte nei vaccini a subunità costituiti dalle glicoproteine di superficie G ed F sia ricombinanti che purificate per cromatografia di affinità (42, 29). I risultati ottenuti nell'animale con questi vaccini sono stati soddisfacenti sia da punto di vista dell'immunogenicità che della protezione contro l'infezione delle vie respiratorie inferiori e superiori. Tuttavia numerosi problemi sono ancora presenti ed ostacolano un impiego sicuro ed efficace della immunizzazione mediante vaccinazione nella prevenzione delle infezioni da RSV in un futuro prossimo. Tra questi la necessità di sperimentare la somministrazione del vaccino anche durante il periodo neonatale, un momento nel quale vi è ancora una immaturità nella risposta immunitaria e la presenza di anticorpi materni specifici a titoli elevati (76).

Bibliografia

- 1) Agah R., Cherry J.D., Garakian A.J.: Respiratory syncytial virus (RSV) infection rate in personnel caring for children with RSV infections. *Am. J. Dis. Child.* 1987; 141: 695-697.
- 2) Agius G., Dindinaud G., Biggar R.J.: An epidemic of respiratory syncytial virus in elderly people: clinical and serological findings. *J. Med. Virol.* 1990; 30: 117-127.
- 3) Akerlind B., Norrby E.: Occurrence of respiratory syncytial virus subtypes A and B strains in Sweden. *J. Med. Virol.* 1986; 19: 241-247.
- 4) Anderson L.J., Hierholzer J.C., Tsou C.: Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 1985; 151: 626-632.
- 5) Arens M.Q., Swierkosz E.M., Schmidt R.R., Armstrong T., Rivetna K.A.: Enhanced isolation of respiratory syncytial virus in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 23: 800-802.
- 6) Bell D.M., Walsh E.E., Hruska K.C., Schnabel K.C., Hall C.B.: Rapid detection of respiratory syncytial virus with a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* 1983; 17: 1099-1101.
- 7) Beem M.: Repeated infections with respiratory syncytial virus. *J. Immunol.* 1967; 98: 1115-1122.
- 8) Bromberg K., Daidone B.: Comparison of immediate and delayed inoculation of HEP-2 cells for isolation of respiratory syncytial virus. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 123-124.
- 9) Bromberg K., Tannis G., Daidone L., Clarke L., Sierra M.F.: Comparison of HEP-2 cell culture and Abbott respiratory syncytial virus enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25: 434-436.
- 10) Chonmaitree T., Howie V.M., Truant A.L.: Presence of respiratory syncytial viruses in middle ear fluids and nasal wash specimen from children with acute otitis media. *Pediatrics* 1986; 77: 698-702.
- 11) Collins P.L., Huang Y.T., Wertz G.W.: Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to viral genes. *J. Virol.* 1984; 49: 572-578.

- 12) Conrad A.D., Christenson J.C., Waner J.L., Marks M.I.: Aerosolized ribavirin treatment of respiratory syncytial virus infection in infants hospitalized during an epidemic. *Ped. Infect. Dis.* 1987; 6: 152-158.
- 13) Dagan R., Landau D., Haikin H. Tal A.: Hospitalization of Jewish and Bedouin infants in southern Israel for bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *Pediatr. Infect. Dis.* 1993; 12: 381-386.
- 14) De Sierra T.M., Kumar M., Wasser E.T., Murphy R.B., Subbarao E.K.: Respiratory syncytial virus-specific immunoglobulins in preterm infants. *J. Pediatr.* 1993; 122: 787-791.
- 15) Englund J.A., Sullivan C.J., Jordan C.: Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *Ann. Inter. Med.* 1988; 109: 203-208.
- 16) Englund J.A., Pledra P.A., Jefferson L.S., Wilson S.Z., Taber L.H., Gilbert B.E.: High-dose, short-duration ribavirin aerosol therapy in children with suspected respiratory syncytial virus infection. *J. Pediatr.* 1990; 117: 313-320.
- 17) Fernie B.F., Gerin J.L.: Immunochemical identification of viral and non viral proteins of the respiratory syncytial virus virion. *Infection and Immunity.* 1982; 37: 243-249.
- 18) Freymuth F., Quibriac M.: Comparison of two new tests for rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections by enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence techniques. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24: 1013-1016.
- 19) Giles T.D., Gohd R.S.: Respiratory syncytial virus and heart disease. *J.A.M.A.* 1976; 236: 1128-1130.
- 20) Gimenez H.B., Cash P., Melvin T.: Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparison of different virus isolates. *J. Gen. Virol.* 1984; 65: 963-971.
- 21) Gleaves C.A., Thomas F.S., Shuster E.A. Pearson G.R.: Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 19: 917-919.
- 22) Glezen W.P., Denny F.W.: Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. *N. Engl. J. Med.* 1973; 288: 498-505.
- 23) Glezen W.P.: Pathogenesis of bronchiolitis-epidemiologic considerations. *Pediatr. Res.* 1977; 11: 239-243.

- 24) Hall C.B., Douglas R.G. Jr.: Clinically useful method for the isolation of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 1975; 131: 1-5.
- 25) Hall C.B., Douglas R.G. Jr., Geiman J.M.: Respiratory syncytial virus infection in infants: quantitation and duration of shedding. *J. Pediatr.* 1976; 89: 11-15.
- 26) Hall C.B., Douglas R.G. Jr.: Respiratory syncytial virus and influenza: practical community surveillance. *Am J. Dis. Child.* 1976; 130: 615-620.
- 27) Hall C.B., Douglas R.G. Jr.: Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J. Pediatr.* 1981; 99: 100-103.
- 28) Hall C.B., Walsh E.E., Schnabel K.C.: The occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: the associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J. Infect. Dis.* 1990; 162: 1283-1290.
- 29) Heilman C.A.: Respiratory syncytial and parainfluenza viruses. *J. Infect. Dis.* 1990; 161: 402-406.
- 30) Henderson F.W., Collier A.M., Clyde W.A. Jr.: Respiratory syncytial virus infections, reinfections and immunity: a prospective longitudinal study in young children. *N. Engl. J. Med.* 1979; 300: 530-534.
- 31) Hendry R.M., McIntosh K.: ELISA for detection of respiratory syncytial virus infection: development and description. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 16: 324-328.
- 32) Huang Y.T., Collins P.L., Wertz G.W.: Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. *Virus Res.* 1985; 2: 157-173.
- 33) Hughes J.H., Mann D.R., Hamparian V.V.: Detection of respiratory syncytial virus in clinical specimens by viral culture, direct and indirect immunofluorescence, and enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 588-590.
- 34) Johnson P.R., Collins P.L.: The fusion glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness. *J. Gen. Virol.* 1988; 69: 2623-2628.
- 35) Johnson P.R., Collins P.L.: Sequence comparison of the phosphoprotein mRNAs of antigenic subgroups A and B of human respiratory syncytial virus identifies a highly divergent domain in the predicted protein. *J. Gen. Virol.* 1990; 71: 481-485.

- 36) Johnston S.L.G., Siegel C.S.: Evaluation of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, centrifugation culture, and conventional culture for the detection of respiratory syncytial virus. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28:2394-2397.
- 37) Kim H.W., Arrobio J.O., Brandt C.D.: Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. I. Importance of the virus in different respiratory disease syndromes and temporal distribution of infection. *Am. J. Epidemiol.* 1973; 98: 216-225.
- 38) Kim H.W., Leikin S.L., Arrobio J.: Cell mediated immunity to respiratory syncytial virus induced by inactivated vaccine or by infection. *Pediatr. Res.* 1976;10: 75-78.
- 39) Krasinski K.: Severe respiratory syncytial virus infection: clinical features, nosocomial acquisition and outcome. *Pediatr. Infect. Dis.* 1985; 4: 250-257.
- 40) Lambert D.M., Pons M.W.: Respiratory syncytial virus glycoproteins. *Virology* 1983; 130: 204-214.
- 41) Lauer B.A., Masters H.A., Wren C.G., Levin M.J.: Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22: 782-785.
- 42) La Via W.V., Marks M.I., Stutman H.R.: Respiratory syncytial virus puzzle: clinical features, pathophysiology, treatment and prevention. *J. Pediatr.* 1992; 121: 503-510.
- 43) Law B.J., De Carvalho V. and the Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada.: Respiratory syncytial virus infections in hospitalized Canadian children: regional differences in patient populations and management practices. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1993; 12: 659-663.
- 44) Le Clair J.M., Freeman J., Sullivan B.F.: Prevention of nosocomial respiratory syncytial virus infections through compliance with glove and gown isolation precautions. *N. Engl. J. Med.* 1987; 317: 329-334.
- 45) Levine S., Klaiber-Franco R., Paradiso P.R.: Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 1987; 68: 2521-2524.
- 46) Marcante R., Dalla Via L., Cavedon G.: Studio preliminare sull'impiego di tests rapidi di identificazione del virus respiratorio sinciziale in bambini affetti da infezioni respiratorie. *Riv. Ital. Ped.* 1988; 14: 669-673.

- 47) Marcante R., Dalla Via L., Cavedon G.: Identificazione del virus respiratorio sinciziale con il test rapido Directigen RSV: confronto con l'isolamento del virus su cellule HEP-2. *Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio* 1990; 4: 31-35.
- 48) Marcante R., Dal Prà R., Cavedon G.: Diagnosi rapida delle infezioni da virus respiratorio sinciziale: confronto fra 3 diversi metodi. *Atti XXII Congresso Nazionale AMCLI, Chia Laguna* 1993; 196-197.
- 49) Marcante R., Cavedon G.: Valutazione del test VIDAS RSV per la ricerca del virus respiratorio sinciziale su campioni di aspirato nasofaringeo. *Atti XXIV Congresso Nazionale AMCLI, Riva del Garda* 1995; 85.
- 50) Masters H.B., Bate B.J., Wren C., Lauer B.A.: Detection of respiratory syncytial virus antigen in nasopharyngeal secretions by Abbott Diagnostics enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 1103-1105.
- 51) Mc Connochie K.M., Hall C.B., Walsh E.E.: Variation in severity of respiratory syncytial virus infection with subtype. *J. Pediatr.* 1990; 117: 52-62.
- 52) Mc Intosh K., Clark J.C.: Parainfluenza and respiratory syncytial virus In Lennette E., Balows A., Hausler W.J., Shadomy H.J. (eds.): *Manual of clinical microbiology* (4° ed.), Washington D.C., American Society for Microbiology, 1985, 763-768.
- 53) Mc Millan J.A., Tristram D.A., Weiner L.B.: Prediction of the duration of hospitalization in patients with respiratory syncytial virus: use of clinical parameters. *Pediatrics* 1988; 81: 22-26.
- 54) Meurman O., Ruuskanen O., Sarkkinen H., Hanninen P., Halonen P.: Immunoglobulin class-specific antibody response in respiratory syncytial virus infection measured by enzyme immunoassay. *J. Med. Virol.* 1984; 14: 67-72.
- 55) Morris J.A., Blount R.E., Savage R.E.: Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1956; 92: 544-549.
- 56) Mufson M.A., Orwell C., Rafner B.: Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 1985; 66: 2111-2114.
- 57) Muslow H.A., Bernard L., Brown R.D., Jamison R.M., Manno J.E., Bocchini J.A., Wilson J.T.: Lack of effect of respiratory syncytial virus infection on theophylline disposition in children. *J. Pediatr.* 1992; 121: 466-471.
- 58) Norrby E., Mufson M.A.: Structural differences between subtype A and B strains of respiratory syncytial virus. 1986; 66: 2721-2729.

- 59) Navas L., Wang E., De Carvalho V., Robinson J. and the Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada.: Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of canadian children. *J. Pediatr.* 1992; 121-123.
- 60) Olmsted R.A., Collins P.L.: The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *J. Virol.* 1989; 63: 2019-2029.
- 61) Parrott R.H., Brandt C.D., Kim H.W.: Respiratory syncytial virus In Lennette E.H. (ed.) *Laboratory diagnosis of viral infections*: New York, Marcel Dekker, Inc. 1985; 453-464.
- 62) Pedneault L., Robillard L., Turgeon J.P.: Validation of respiratory syncytial virus enzyme immunoassay and shell-vial assay results. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 2861-2864.
- 63) Porter D.D., Muck K.B., Prince G.A.: The age dependance of respiratory syncytial virus growth in ferret lung can be shown in organ and monolayer cultures. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1980; 15: 415-423.
- 64) Rabalais G.P., Stout G.G., Ladd K.L., Cost K.M.: Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell-vial assay and monoclonal antibody pool. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 1505-1508.
- 65) Rechsteiner J., Winkler K.C.: Inactivation of respiratory syncytial virus in aerosol. *J. Gen. Virol.* 1969; 5: 405-410.
- 66) Rice R.P., Loda F.: A roentgenographic analysis of respiratory syncytial virus pneumonia in infants. *Radiology* 1966; 87: 1021-1027.
- 67) Richardson L.S., Yolken R.H., Belshie R.B., Camargo E., Kim H.W., Chanock R.M.: Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of serological response to respiratory syncytial virus infection. *Infect. Immun.* 1978; 20: 660-664.
- 68) Sanchez I., De Koster J., Powell R.E., Wolstein R., Chernick V.: Effect of racemic epinephrine and salbutamol on clinical score and pulmonary mechanics in infants with bronchiolitis. *J. Pediatr.* 1993; 122: 145-151.
- 69) Sinnot J.T., Cullison J.P., Sweeney M.S.: Respiratory syncytial virus pneumonia in a cardiac transplant recipient. *J. Infect. Dis.* 1988; 158: 650-651.
- 70) Smith M.C., Creutz C., Huang Y.T.: Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by shell-vial technique. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 463-465.

- 71) Subbarao E.K., Whitehurst N.J., Waner J.L.: A comparison of two enzyme linked immunosorbent assay (EIA) kits with immunofluorescence and isolation in cell culture for detection of respiratory syncytial virus (RSV) . *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1987; 8: 229-234.
- 72) Svenson P.D., Kaplan M.H.: Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by a commercial enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 23: 485-488.
- 73) Swierkosz E.M., Flanders R., Melvin L., Miller J.D., Kline M.W.: Evaluation of the Abbott TESTPACK RSV enzyme immunoassay for detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal swab specimen. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27: 1151-1154.
- 74) Tissing W.J.E., Van Steensel-Moll H.A., Offringa M.: Severity of respiratory syncytial virus infections and immunoglobulin concentrations. *Arch. Dis. Child.* 1993; 69: 156-157.
- 75) Treuhart M.W., Soukup J.M., Sullivan B.J.: Practical recommendations for the detection of pediatric respiratory syncytial virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22: 270-273.
- 76) Tristram D.A., Welliver R.C., Mohar C.K., Hogerman D.A., Hildreth S.W., Paradiso P.: Immunogenicity and safety of respiratory syncytial virus subunit vaccine in seropositive children 18-36 months old. *J. Infect. Dis.* 1993; 167: 191-195.
- 77) Vikersfors T., Grandien M., Olcen P.: Respiratory syncytial viral infection in adults. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 136: 561-564.
- 78) Walsh E.E., Hruska J.F.: Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J. Virol.* 1983; 47: 171-177.
- 79) Walsh E.E., Schlesinger J.J., Brandiss M.W.: Purification and characterization of GP90, one of the envelope glycoproteins of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 1984; 65: 761-767.
- 80) Walsh E. E., Brandiss, M. W., Schlesinger, J.J.: Purification and characterization of the respiratory syncytial virus fusion protein. *J. Gen. Virol.* 1985; 66: 409-415.
- 81) Walsh E.E., Brandiss M.W., Schlesinger J.J.: Immunological differences between the envelope glycoproteins of two strains of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 1987; 68: 2169-2176.

- 82) Walsh E.E., Hall C.B.: Respiratory syncytial virus In Schmidt N.J., Emmons R.W. (eds.): Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections. New York, American Public Health Association, 1989; 693-712.
- 83) Waner J.L., Whitehurst N.J., Todd S.J., Shalaby H., Wall L.V.: Comparison of Directigen RSV with viral isolation and direct immunofluorescence for the identification of respiratory syncytial virus. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 480-483.
- 84) Welliver R.C., Kaul T.N., Ogra P.L.: The appearance of cell-bound IgE in respiratory-tract epithelium after respiratory syncytial virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1980; 303: 1198-1202.
- 85) Welliver R.C., Kaul T.N., Putnam T.I., Sun M., Riddlesberger K., Ogra P.L.: The antibody response to primary and secondary infection with respiratory syncytial virus: kinetics of class-specific responses. *J. Pediatr.* 1980; 96: 808-813.
- 86) Welliver R.C., Wong D.T., Sun M.: The development of respiratory syncytial virus-specific IgE and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection. *N. Engl. J. Med.* 1981; 305: 841-846.
- 87) Welliver R.C.: Detection, pathogenesis, and therapy of respiratory syncytial virus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1988; 1: 27-39.
- 88) Zweiman B., Schoenwetter W.F., Hildreth E.A.: The relationship between bronchiolitis and allergic asthma. *J. Allergy* 1966; 37: 48-52.

Indice

Editoriale	pag. 3
Introduzione	» 5
Classificazione e struttura	» 6
Sottotipi di RSV.....	» 8
Epidemiologia	» 9
Distribuzione geografica.....	» 9
Modalità di trasmissione.....	» 10
Ipotesi patogenetiche.....	» 11
Patologia	» 13
Infezione primaria.....	» 13
Infezione del neonato.....	» 14
Infezioni recidivanti	» 15
Infezione nell'adulto	» 15
Infezioni ospedaliere	» 16
Diagnosi di laboratorio	» 17
Isolamento del virus, Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni	» 17
Scelta della linea cellulare	» 19
Isolamento tradizionale	» 20
Isolamento su shell-vial	» 21
Diagnosi rapida mediante ricerca di antigeni di RSV	» 23
Test di immunofluorescenza	» 23
Test immunoenzimatico.....	» 26
Test immunoenzimatico su membrana	» 26
Sensibilità e specificità dei tests rapidi per la ricerca di antigeni rispetto all'isolamento virale	» 27
Diagnosi sierologica	» 29
Terapia.....	» 31
Vaccinazione	» 33
Bibliografia	» 34
Indice	» 42

Caleidoscopio



Italiano

1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna, Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesità*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La b-endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico ed immunologico ed immunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.
31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.

37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriagonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterina nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biorci L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Basaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Iperensione Arteriosa*. Febbraio '93.

78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow*. Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza*. Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio '94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatore biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori*. Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P., Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98. La Vecchia C., D'avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.
101. Cogato I., Montanari E.: *La Sclerosi Multipla*. Aprile '96.
102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale*. Maggio '96.
103. Fiori G.M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.
104. Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.



Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 14, numero 104


Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0360 509973
E-mail: rassu@mbox.vol.it

Responsabile Commerciale
Alessandra Pater

EDITORE



 **MEDICAL SYSTEMS SpA**

Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti

Fina Grandeppieno
Flavio Damarciasi

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 801005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 803498- 809070.

Internet URL: <http://www.vol.it/pandora>

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay, Manuali Pratici Immulite, Caleidoscopio Español, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Caleidoscopio literario, Pandora, The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

Stampa

ALGRAPHY S.n.c.
Passo Ponte Carrega, 62 R. - GENOVA
tel. 010/8366272 - Fax 010/8358069

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Settembre 1996
Sped. in Abb. Post. 50%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6
DPR 627/78