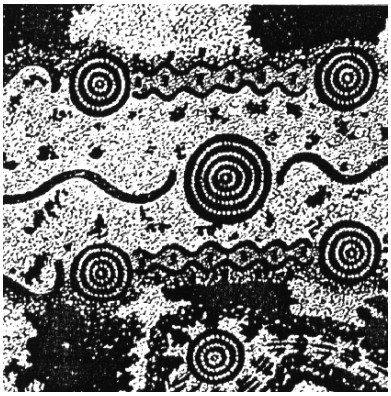
Caleidoscopio

Italiano



Andrea Proietti
Paolo Lanzafame

Il virus di Epstein-Barr

Istituto di Microbiologia
Ospedale Civile di Udine

93

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

MEDICAL SYSTEMS S.P.A.

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1995

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 ed allo stesso tempo chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare solo proprie personali 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 e fax) 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 esplicativa (in bianco e nero eccetto in 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 devono essere 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, quando pubblicati, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro ed in particolare 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 e le diapositive 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 spedite al Direttore Responsabile con una 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 cento 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

L'infezione causata dal virus di Epstein-Barr, nei paesi industrializzati, arriva ad interessare quasi tutta la popolazione e la maggior parte degli adulti risulta sieropositiva per l'HBV.

Il 50% della popolazione contrae infatti l'infezione primaria durante l'adolescenza con un decorso lieve o inapparente mentre i restanti soggetti vanno incontro all'infezione nel periodo di passaggio alla giovinezza e questa si manifesta con il quadro tipico della mononucleosi infettiva.

L'interesse del medico per l'EBV non si limita solo al quadro clinico della mononucleosi infettiva ma comprende anche altre situazioni meno frequenti come il carcinoma nasofaringeo o alcuni linfomi a cellule B.

La conoscenza quindi di questa infezione è di estremo interesse ed una completa e ragionata comprensione di tutti i metodi sierologici oggi a disposizione del medico per una corretta diagnosi è quanto mai necessaria. Sono sempre più numerosi i laboratori che dalla semplice ricerca degli anticorpi eterofili stanno ampliando gli orizzonti diagnostici con un panel più completo. Considerando che questo settore aveva nel 1993 un mercato in Italia di 8,5 miliardi, sicuramente si richiede al medico una perfetta conoscenza del significato di quanto oggi ha a disposizione, per poter porre dei quesiti corretti ed interpretare i risultati degli esami sierologici.

Questo volume vuole proprio aiutare a comprendere quanto noi oggi sappiamo sull'argomento in modo molto semplice ma non per questo superficiale.

Andrea Proietti, laureato in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di L'Aquila, presta la sua opera, in qualità di Collaboratore biologo e successivamente in qualità di Coadiutore biologo, presso l'Istituto di Microbiologia dell'Ospedale Civile di Udine.

E' autore di oltre 50 pubblicazioni su riviste di Microbiologia su temi di carattere batteriologico, farmacologico, epidemiologico e immunologico e si è interessato con particolare curiosità al problema della diagnostica della infezione da EBV.

Paolo Lanzafame, Laureato in Medicina e Chirurgia presso l'Università degli Studi di Firenze si è specializzato in Microbiologia presso L'Università degli Studi di Padova. Ufficiale medico dell'E.I., ha prestato la propria opera presso il Policlinico Militare di Padova come direttore del Laboratorio di Analisi Cliniche. In questo periodo ha partecipato a missioni umanitarie in Albania e Mozambico. Attualmente è aiuto corresponsabile presso l'Istituto di Microbiologia dell'Ospedale Civile di Udine.

E' autore di numerose pubblicazioni su vari argomenti di patologia clinica, in particolare farmacologia, batteriologia ed ematologia.

Sergio Rassu

Storia

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è stato scoperto nel tentativo di trovare la causa di un linfoma, il più comune tumore che colpiva i bambini di alcune regioni dell'Africa centrale.

Tale sindrome clinica era nota, retrospettivamente, ai clinici e ai patologi fin dall'inizio del XX secolo, ma solo nel 1958 Dennis Burkitt la descrisse dettagliatamente definendone le caratteristiche cliniche ed epidemiologiche.(7)

Nel 1962, lo stesso Burkitt suggerì che tale linfoma, che da lui prese il nome (BL), potesse essere causato da un virus.(8) Nel 1964, Epstein e Barr (16) e Pulvertaft (55) riportarono contemporaneamente in alcune pubblicazioni su *Lancet* il primo tentativo di produrre linee cellulari linfoblastoidi da campioni di biopsie di linfoma di Burkitt. Successivamente furono trovate, in sezioni sottili di tali linee cellulari, particelle virali morfologicamente simili al gruppo degli Herpesvirus (15).

Tali particelle furono riscontrate anche in linee linfoidi generate da pazienti con diverse malattie, da pazienti con infezione mono nucleotica e da individui apparentemente sani (40). Cellule che producevano particelle virali furono trovate da W.e G.Henle (23) nell'intento di ottenere antigeni rilevabili con immunofluorescenza indiretta usando sieri di pazienti con linfoma di Burkitt come fonte di anticorpi.

Sulla base di altri studi epidemiologici gli Henle e i loro collaboratori dimostrarono che EBV era anche l'agente eziologico della mononucleosi infettiva, dal momento che anticorpi contro gli antigeni riscontrati nelle linee cellulari BL erano assenti prima della mononucleosi e comparivano dopo la malattia (25). Una sorprendente proprietà biologica dell'EBV, vale a dire la sua capacità di causare continua crescita di linee cellulari linfoidi, fu scoperta dalla coltivazione contemporanea di cellule letalmente X-irradiate di una linea BL (JiJoye) e da linee leucemiche (LS) con linfociti freschi neonatali (28, 42).

Le cellule neonatali furono indotte a proliferare indefinitivamente in vitro.

Che il principale trasformatore fosse EBV fu dimostrato da una serie di esperimenti nei quali si dimostrava che l'attività trasformante era presente in un ultrafiltrato (53), che poteva essere purificato

con centrifugazione a gradiente di zucchero (17) e che l'attività trasformante era neutralizzata da siero umano contenente anticorpi anti-EBV (44).

Si dimostrò, quindi, che il virus era capace di immortalizzare i linfociti di alcuni primati non umani (43). Alcune di queste linee cellulari rilasciavano grande quantità di virus che furono utilizzati per caratterizzazioni biologiche, immunologiche e biochimiche.

Questo fu il primo metodo per coltivare attendibilmente il virus.

Struttura

L'EBV è un herpesvirus, sottofamiglia Gammaherpesvirinae, chiamato, nella nomenclatura ufficiale Herpes virus umano 4.

L'EBV è un grande virus a DNA di 150 - 200 µm. di diametro; l'acido nucleico è costituito da una doppia elica lineare con più di 172 Kb, contenuto in un capside a struttura icosaedrica di circa 100 µm. di diametro, con 162 capsomeri (Fig.1).

Il pericapside, a struttura lipoproteica, ha forma irregolare e viene acquisito durante la gemmazione del virus dalla membrana plasmatica della cellula ospite (31, 78).

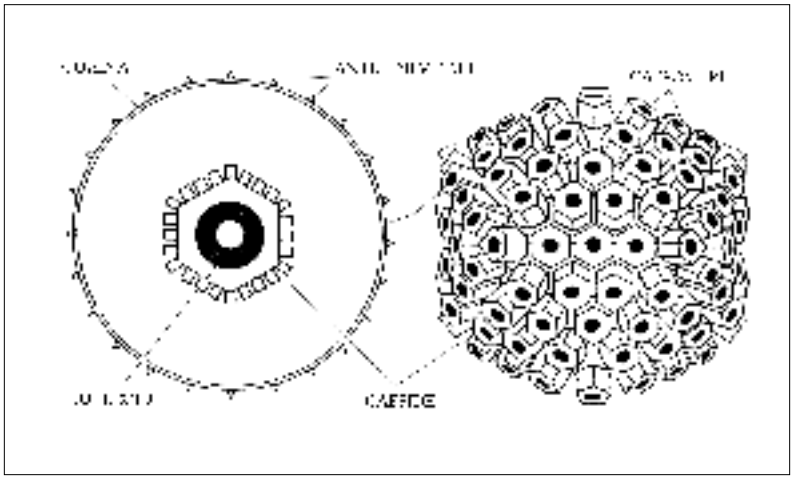


Figura 1. Struttura del virus.

Il genoma virale è costituito da una regione corta ed una lunga, entrambe singole, con sequenze terminali ripetute multiple che, probabilmente, permettono la circolarizzazione del DNA (78). Il DNA dell'EBV fu caratterizzato la prima volta nel 1970 come una grande, lineare molecola a doppia elica con contenuto G+C del 59% e facilmente separabile dal DNA cellulare.

Questo DNA virale fu usato come probe per dimostrare la frequente presenza di DNA di EBV nel linfoma di Burkitt e nel carcinoma nasofaringeo (48, 79).

Dalla ibridizzazione degli acidi nucleici si scoprì che alcune linee BL, come quelle trasformate in vitro che non erano attive produttrici di particelle virali mature, non contenevano affatto genomi di EBV. In tali linee cellulari, il genoma era presente come DNA circolare extracromosomiale "latente"(2). Alla fine degli anni '70, il DNA di diversi ceppi di EBV moltiplicati in cellule di primati non umani (marmoset) fu clonato in plasmidi batterici o in fagi lambda (12, 66). La determinazione dell'intera sequenza di DNA ha facilitato una dettagliata esplorazione biologica molecolare del virus.

Sistemi antigene

Sono stati definite differenti classi di sistemi antigeni in base alla fase del ciclo vitale in cui sono espressi.

Antigene nucleare

Tutte le cellule che ospitano il genoma EBV allo stato latente, esprimono un complesso neoantigene nel nucleo, chiamato EBNA (Epstein Barr Nuclear Antigen)(55).E' noto che EBNA è un gruppo di prodotti dei quali almeno 6 sono codificati da geni EBV.

Sebbene tutti i prodotti EBNA conosciuti siano espressi, in vitro, nei linfociti B infetti in modo latente, c'è una considerevole variazione nell'espressione di questi prodotti nelle cellule infettate da EBV in vivo.

I prodotti EBNA hanno in comune diverse caratteristiche oltre alla origine nucleare e all'espressione durante la latenza.

Tutti sono polimorfici, cioè la loro struttura differisce da un ceppo di virus all'altro (59, 62). Molti di loro sono proteine leganti il DNA (18, 30). Tutti sembrano espressi da mRNA derivato da ampio accoppiamento (67).

Molte proteine mature sono formate da mRNA bi o policistronici (76). EBNA-1 (BKRF1) è un polipeptide polimorfo di 60-80 Kd a varia mobilità elettroforetica. Le sue variazioni di grandezza sono dovute ad un numero di gruppi glicina-alanina che si ripetono all'interno del polipeptide. E' collocato sui cromosomi in metafase e agisce da divisore dell'episoma EBV e come trans-attivatore dei geni latenti.

EBNA-2 (BYRF1) sembra essere richiesto per l'inizio della immortalizzazione. La sua composizione varia tra ceppo e ceppo.

Sono stati ben definiti due tipi di EBNA-2 chiamati A(di circa 90 Kd) e B (di circa 78 Kd) o X (per X50-7) e J (per JiJoye) (58) differenti per mobilità elettroforetica. Gli antisieri umani riconoscono l'uno o l'altro tipo di EBNA-2 a seconda da quale virus sia stato infettato l'individuo. EBNA-3 consiste di tre prodotti genici (BLRF3/BERF1, BLRF3/BERF2b e BLRF3/BERF4) ad alto peso molecolare (da 135 a 165 Kd) a funzione sconosciuta. EBNA-4, chiamato anche leader protein (LP), è un set polimorfico di proteine a funzione ancora sconosciuta.

Antigene di membrana rivelato dai Linfociti (LYDMA)

Il sangue periferico di individui sani sieropositivi contiene normalmente dei linfociti T che possono essere indotti ad uccidere le cellule B infettate da EBV.L'antigene indotto dal virus sulla superficie delle cellule B infettate che è riconosciuto dai linfociti T citotossici non è stato ancora sierologicamente definito e, perciò, può essere identificato sulle superfici cellulari solo grazie all'uso di cellule T specificatamente attivate in prove di attività citotossica.

L'antigene è espresso su tutte le cellule infettate ed è compatibile con la crescita cellulare continua. E' attualmente noto che, in seguito all'infezione di cellule B quiescenti da parte di EBV, il LYDMA è espresso subito dopo l'EBNA ed è concomitante, ma indipendente, dalla sintesi di DNA cellulare.

Antigene di membrana (MA)

L'involucro virale, pur essendo acquisito quando il virus attraversa la membrana nucleare, contiene antigeni in comune con quelli ritrovati sulle membrane citoplasmatiche di cellule che producono virioni. Gli antigeni di membrana (MA) sono responsabili del legame del virus al recettore e della fusione dell'involucro virale con la membrana cellulare. Il complesso MA consta di 5 proteine i cui pesi molecolari sono circa 350, 220, 140, 110 e 85 Kd (49, 50, 71); alcune di queste sono proteine precoci, espresse indipendentemente dalla sintesi di DNA virale e compatibili con la crescita cellulare continuata, mentre altre, più tardive, sono espresse solo sulle cellule entrate nel ciclo litico. Gli anticorpi diretti contro l'MA neutralizzano l'infettività virale.

Antigene precoce

Gli antigeni precoci, Early Antigens (EA), sono un gruppo di componenti non strutturali la cui produzione non richiede sintesi di DNA virale (26).Fanno parte degli antigeni sintetizzati quando una delle cellule linfoidi è spontaneamente attivata alla replicazione virale o quando il ciclo virale replicativo è indotto da stimoli esogeni. Gli EA sono composti da una serie di polipeptidi.

Sono stati definiti principalmente due componenti di EA, chiamati "diffuso" (D) e "ristretto"(R), definiti sulla base della loro distribuzione nella cellula e della loro differente solubilità al metanolo (27) (il componente R a differenza di quello D è solubile al metanolo).

Anche l'attivatore della replicazione ZEBRA è un antigene EA, e probabilmente esistono altri componenti che fanno parte del complesso EA, come la DNA polimerasi virale, la DNAasi virale e la timidina kinasi (36).

L'importanza degli EA è che essi possono indicare, in vivo, l'inizio della replicazione virale.

Non tutti i sieri umani che hanno anticorpi contro EBV posseggono anticorpi contro il complesso EA: pazienti con infezione acuta o con infezione attiva cronica da EBV tendono a produrre anticorpi contro gli EA, ma questi anticorpi sono normalmente assenti nei sieri di pazienti sani con remota esposizione al virus.

Antigene Virocapsidico (VCA)

Il sistema VCA è stato il primo sistema antigene ad essere descritto (23) ed è stato il miglior mezzo nello studio della epidemiologia delle infezioni da EBV. Questo complesso antigenico comprende i componenti strutturali del capside virale che sono sintetizzati in una cellula infettata al termine del ciclo litico.

Anticorpi anti-VCA compaiono dopo l'infezione e permangono per tutta la vita.

Ciclo biologico

Lo spettro d'ospite del virus è molto limitato; finora è stato possibile coltivarlo solo su linfociti B e cellule epiteliali rino- faringee umane e di alcuni primati (60).

Queste cellule possiedono il recettore di superficie per l'EBV; tale recettore è stato identificato in una glicoproteina di 140 Kd, designata CR2 o CD21 che svolge funzione di recettore anche per la frazione C3d del Complemento.

Il legame del virus al suo recettore è mediato da una glicoproteina di superficie, la gp 350/220, che non solo media l'adsorbimento ma anche la fase iniziale della penetrazione (31); anticorpi monoclonali diretti contro queste glicoproteine e contro il CD21 inibiscono il legame EBV-cellula e bloccano l'infettività.

Dopo l'adsorbimento il virus penetra nella cellula grazie ad un processo di endocitosi e si ritrova in vescicole a membrana liscia (60). La gp 350/220 potrebbe avere un ruolo nella fusione del pericapside virale con la membrana plasmatica anche se in questo processo un'altra glicoproteina virale, la gp 85, sembra rivestire maggiore importanza (31)(45).

Come gli altri virus erpetici, l'EBV una volta penetrato nella cellula può vivere allo stato latente o represso, cioè non induce la produzione, nei linfociti infettati, di particelle virali e non provoca la morte della cellula ospite (31, 78, 24).

Le cellule infettate, coltivate in vitro, possono essere divise in due gruppi:

a) cellule produttrici, in cui il genoma virale può attivarsi spontaneamente e dare origine ad antigeni virali e a particelle infettanti;

b) cellule non produttrici, in cui il genoma virale non si attiva spontaneamente e, anche se fosse attivato artificialmente, origina un processo abortivo promuovendo la produzione di antigeni e non di particelle infettanti (24).

Le particelle virali infettanti sono di due tipi:

a) litiche, che inducono la produzione di particelle virali figlie con lisi e morte della cellula ospite;

b) trasformanti, che provocano la moltiplicazione indefinita dei linfociti infettanti (immortalizzazione)(60, 24).

Una volta penetrato all'interno della cellula ospite il virus perde il rivestimento e il genoma penetra nel nucleo dove generalmente viene represso.

Nelle linee cellulari trasformate, il DNA virale può indurre la produzione di nuove proteine che si ritrovano sia nel nucleo sia sulla membrana plasmatica della cellula ospite (31, 24).

Queste non sono proteine strutturali, ma rappresentano, comunque, una frazione antigenica; la più importante e quantitativamente più rappresentata di queste è l'antigene nucleare.

L'EBNA si trova nella massa nucleare associato alla cromatina cellulare ed è espresso da tutte le cellule che portano il genoma virale. Nelle cellule non produttrici, la presenza dell'EBNA è l'unico segno di infezione trasformante da parte dell'EBV.

Nelle cellule infettate che, spontaneamente o sperimentalmente, vanno incontro al ciclo litico si ha la produzione di molti altri antigeni e, se non fosse bloccato a stadi intermedi del ciclo, anche particelle virali figlie.

Il montaggio del virus avviene all'interno del nucleo da dove le particelle virali passano nel citoplasma e fuoriescono dalla cellula ospite attraverso la membrana plasmatica. Durante questo passaggio il virione assume il pericapside derivato dalla membrana cellulare contenente gli antigeni di membrana (78).

Gli eventi della infezione da EBV nell'uomo, comunque, sono meno chiari rispetto a quanto descritto per le linee cellulari in vitro.

Immortalizzazione dei Linfociti

La principale attività biologica dell'EBV, attività che costituisce la base nella patogenesi della infezione proliferativa, è la capacità del virus di provocare in vitro la proliferazione indefinita dei linfociti, processo denominato immortalizzazione.

I linfociti B recettivi sono cellule essenzialmente ben differenziate che hanno già subito un riassetto VDJ e un cambiamento di classe della catena pesante (6, 5).

E' inoltre certo che il virus può immortalizzare cellule pre-B e, occasionalmente cellule che hanno geni per immunoglobuline non ordinate nella configurazione germinale. (19)

L'efficienza del processo di immortalizzazione, come studiato in vitro, è abbastanza alto.

Si ritiene che il processo si compia in due fasi:

a) una fase iniziale di attivazione delle cellule B, comandato dal legame del virus alla superficie della cellula;

b) una conseguente fase di permanente blastogenesi che richiede l'espressione dei prodotti del gene EBV.

Sulla base degli esperimenti effettuati per determinare il tempo dopo il quale gli anticorpi neutralizzanti non inibiscono più la immortalizzazione, è stato dimostrato che l'adsorbimento virale e la penetrazione delle cellule B da parte del virus, è completato dopo 12 ore.

Seguendo l'infezione, si nota una ordinata progressione degli eventi che iniziano con la sintesi degli antigeni nucleari (EBNA), circa 6 ore dopo l'infezione (56).

L'EBNA-2 sembra essere prodotto per primo, ed alcuni degli altri EBNA sono dipendenti dalla sintesi dell'EBNA-2 (47, 57).

La sintesi degli EBNA si ha prima della stimolazione della sintesi del DNA virale o cellulare, stimolazione che si ha dopo circa 20 ore dalla comparsa degli EBNA.

Le prime mitosi delle cellule infettate dal virus si osservano dopo circa 36-48 ore dall'inoculo.

Il genoma dell'EBV, che è lineare all'interno del virus, diventa circolare dopo l'infezione: questo processo evidentemente non richiede EBNA o blastogenesi.

Successivamente, durante la reazione di immortalizzazione, il genoma dell'EBV viene amplificato fino a quando ogni cellula immortalizzata non contenga più copie del genoma virale, anche se le trasformazioni possono avvenire con l'aggiunta di una particella in 10.000 cellule.

Tale scoperta indica che il DNA dell'EBV intracellulare replica più velocemente del DNA cellulare durante i primi eventi della trasformazione, probabilmente sotto l'influenza di enzimi di replicazione virus-specifici.

La maggioranza dei genomi virali si trova dentro le cellule sotto forma di plasmidi circolari legati al DNA cromosomiale cellulare non covalentemente.(21, 38)

Il processo di immortalizzazione è associato alla espressione delle differenti funzioni dei linfociti B, come la sintesi e la secrezione di immunoglobuline.

E' inoltre accompagnato dalle espressioni di una serie di prodotti di attivazione delle cellule B, come Blast-1 e Blast- 2 (34, 72, 73).

Il secondo, Blast-2 (CD23), glicoproteina di 45 Kd, è particolarmente importante nel sollecitare la continua crescita delle cellule B.

Come ormai provato da numerosi esperimenti, la reazione di immortalizzazione è il risultato della interazione di differenti prodotti del gene di EBV.

Le cellule immortalizzate conservano una larga porzione del genoma; se si esamina, infatti, un Southern blot del DNA intracellulare preparato da cellule trasformate in vitro, si trovano quasi tutti i frammenti rappresentativi del DNA virale.

Inoltre, da molte linee si può liberare una piccola quantità di virus infettivi con la tecnica della X-irradiazione eseguita da colture di linfociti freschi (77).

Esperimenti di mutagenesi radiobiologica forniscono l'indiretta evidenza della partecipazione di una larga parte del genoma dell'EBV nella iniziazione della trasformazione.

Esperimenti di inattivazione condotti con raggi X, UV e raggi gamma indicano che il numero dei bersagli per la eliminazione delle proprietà trasformanti del genoma è ampio, dal 25 al 100 % (22, 37).

I prodotti virali gene codificati sono 10 e tutti giocano un ruolo nel processo di immortalizzazione.

Questi prodotti comprendono 6 EBNA, la proteina latente di membrana, 2 piccoli RNA (EBER-1 e EBER-2) e un m-RNA.

Conversione

In molti tumori Africani e non Africani, classificati come BL in base alla istologia delle linee cellulari, sono state riscontrate le caratteristiche del fenotipo BL pur non esprimendo EBNA e non contenendo genoma EBV.

Tali linee cellulari possiedono recettori per EBV e possono essere trasformate in trasportatori permanenti di EBV in seguito all'aggiunta del virus.

Questo processo, chiamato conversione, ha permesso l'analisi delle proprietà biologiche dell'EBV in una popolazione stabile di cellule clonali.

La conversione può essere compiuta da ambedue i biotipi di EBV, il trasformante e il non trasformante. Subito dopo l'esposizione delle linee cellulari al genoma virale compaiono alcune cellule con EBNA.

Gradualmente la quantità di cellule EBNA-positive aumenta e sembra che tali cellule abbiano, in vitro, un vantaggio selettivo nella crescita.

La conversione di linee cellulari BL genoma-negativo con ceppi immortalizzanti di EBV porta all'aumento del recettore EBV C3d e dell'antigene (Bac-1) di attivazione della restrizione di cellule B,

antigene che è un potenziale recettore per il fattore di crescita delle cellule B (9).

L'importanza del processo di conversione risiede nell'interpretazione del significato del ritrovamento di genomi EBV in svariate neoplasie B-linfoidi. La conversione dimostra che la persistente infezione di EBV può avvenire in cellule che sono state già immortalizzate da qualche altro meccanismo.

Latenza

La caratteristica biologica della relazione EBV-cellula nelle linee linfoidi immortalizzate o convertite in vitro e nelle cellule del carcinoma nasofaringeo infettate in vitro, è la latenza.

Anche alcune cellule normali, particolarmente nello strato basale, possono andare incontro a infezione latente. Il fenomeno "latenza" implica almeno tre distinti processi:

1) Il genoma virale persiste intracellularmente nella sua interezza. L'EBV esiste come più copie di un plasmidio a DNA a doppio filo circolare, che replica semiconservativamente nella prima fase S usando DNA polimerasi cellulare (1).

2) Il genoma non è espresso nella sua interezza: l'EBV esprime, cioè, un limitato set di geni. I meccanismi per i quali questi geni sono espressi e per quali sono repressi numerosi geni rappresentanti la fase replicativa, non sono ancora chiari.

Il genoma virale durante la latenza può essere metilato o legato a nucleosomi o altre proteine DNA-leganti che influiscono sulla sua espressione (33, 64).

In alcune linee cellulari linfoidi trasformate in vitro nelle quali il virus è completamente latente solo un limitato numero di regioni del genoma va incontro a maturazione; un più elevato numero di regioni è trascritto in un eterogeneo RNA nucleare (hnRNA) ma non è processato dall'mRNA e non è trasportato al citoplasma (32).

3) Il genoma può essere attivato alla espressione, processo chiamato "induzione".

Recentemente è stato identificato un gene EBV, chiamato ZEBRA (BZLF1) come attivatore del passaggio fra latenza e replicazione (10, 11, 70).

La latenza può essere interrotta, e il genoma attivato alla espressione, da una varietà di manovre, una delle quali è la semplice coltura in vitro.

Nelle cellule infettate in vitro (es. cellule tumorali del BL o linfociti B presenti nel sangue nella mononucleosi infettiva), il genoma è di solito latente; si può ritrovare EBNA ma non antigeni capsidici o virioni.

Se le cellule vengono coltivate in vitro, una parte di queste diviene capace di produrre virioni.

Le cellule del carcinoma nasofaringeo, che mantengono EBV in uno stato latente, possono essere indotte ad esprimere virioni dal trapianto in topo non protetto (75).

Nelle linee cellulari di linfoblasti, linee utilizzate per la trasformazione in vitro, la maggioranza delle cellule ospita il virus allo stato latente, e poche cellule, normalmente meno del 10 %, sono spontaneamente attivate a rilasciare il virus.

La frequenza di tale spontanea transizione dalla latenza alla sintesi del virus è influenzata dall'età e dalla specie del donatore le cui cellule sono trasformate (Fig. 2): cellule neonatali sono meno produttive di cellule di adulti e le cellule umane, in genere, sono meno produttive delle cellule di primati non umani.

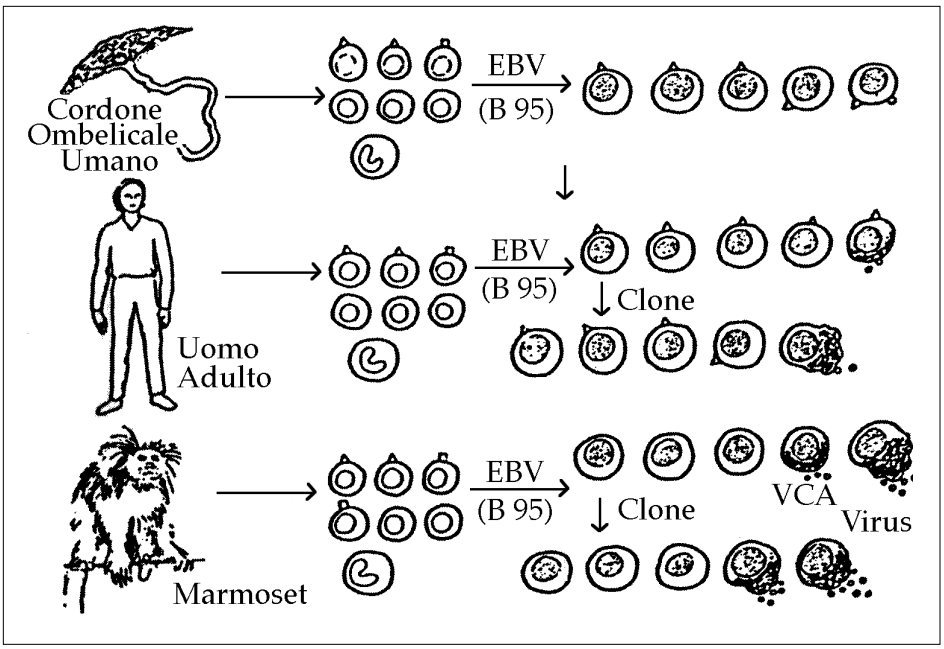


Figura 2. Espressione virale ospite correlata.

La latenza può essere attivata anche da stimoli esogeni di natura chimica e fisica; fra gli agenti chimici induttori vi sono composti di varia natura, tutti stimolatori di differenziazione, come i derivati alogenati dell'uridina e l'estere di forbolo, il promotore di tumore indicato come cofattore nella genesi del NPC.

Tutti gli stimoli induttori, comunque, agiscono sull'espressione del gene ZEBRA (61), il gene represso nel genoma EBV latente.

Se ZEBRA è introdotto stabilmente nelle linee cellulari con genoma EBV latente, esso può attivare l'espressione del ciclo replicativo completo (20) con attivazione di espressione di una serie di antigeni early (EA) sia componenti del complesso D (BMLF1 e BMRF1) che del complesso R (BHRF1 e BORF2). Questi geni sono evidentemente i primi targets dell'azione di ZEBRA.

Patologia

L'EBV può essere responsabile, a seconda dei casi, di:
a) infezione inapparente
b) mononucleosi infettiva (MI)
c) linfoma di Burkitt (BL)
d) carcinoma nasofaringeo (NPC)

Esso è stato associato, anche a disturbi linfoproliferativi in soggetti immunodepressi e la sua presenza è stata molte volte riportata in soggetti colpiti da altre patologie quali Linfomi di Hodgkin, l'artrite reumatoide e il LES.

Mononucleosi infettiva (MI)

La MNI è una malattia linfoproliferativa acuta benigna e autolimitante.

La trasmissione della malattia avviene più frequentemente per contatto salivare diretto (kiss disease), ma è possibile anche per via aerogena, da materiale contaminato (stoviglie, asciugamani, ecc.) e per contagio venereo.

Il periodo di incubazione è di circa 6 settimane ed insorge più frequentemente in primavera ed in autunno.

Nella sua forma tipica, l'inizio è rapidamente progressivo e la sintomatologia è caratterizzata da astenia, angina, disfagia, febbre e malessere generale non ben definito. La fase di stato, che si instaura in meno di una settimana, presenta già un quadro clinico particolare che orienta alla diagnosi: astenia e febbre, angina, adeno e splenomegalia (60, 51).

Tra i sintomi generali l'astenia è costante e può raggiungere la prostrazione, dura per tutto il decorso della malattia e può persistere, anche per lungo tempo, dopo la guarigione clinica.

L'innalzamento della temperatura corporea è variabile da una febbricola ai 38-40°C (60).

Le manifestazioni faringee sono presenti nell'80-85 % dei casi, si accompagnano a disfagia ma di solito sono lievi e scompaiono dopo una settimana circa. Più frequentemente si tratta di una angina eritematosa, ma può essere più severa assumendo l'aspetto di una

angina follicolare o pseudodifterica o simulando un'angina di Vincent. Le placche, se presenti, si lasciano staccare con facilità e senza sanguinare. Sono spesso presenti petecchie tra il palato molle e duro associate a edema delle palpebre superiori (51).

La linfoadenomegalia è presente nella quasi totalità dei casi; può essere generalizzata, ma la sede più frequente è la laterocervicale. La tumefazione è di volume modesto (dalla grandezza di un fagiolo a quella di una nocciola), di consistenza duro-elastica, sensibile alla pressioni. I linfonodi rimangono palpabili anche per diverse settimane.

Possono essere presenti anche manifestazioni cutaneo-mucose sotto forma di un fugace esantema morbilliforme o scarlattiniforme o sotto forma di eruzioni pomfoidi maculo-papulose, in particolare nei pazienti trattati con ampicillina.

La splenomegalia, di solito modesta, può essere anche di notevoli dimensioni, è presente nel 70% dei casi e ad essa può essere associata discreta epatomegalia. L'epatite, possibile nel contesto di una MNI, è di regola benigna; anche in assenza di ittero e di epatomegalia è frequente notare un aumento delle gamma-GT, ALP e transaminasi.

Rare complicazioni si possono avere a carico del sistema nervoso (meningite, encefalite, paralisi dei nervi cranici, sindrome di Guillain-Barrè), del cuore (miocarditi, pericarditi acute) o dell'apparato respiratorio (pleurite atipica, epiglottite).

Complicanze renali, genitali, pancreatiche e tiroidee sono eccezionali, così come le adeniti mesenteriche e la rottura della milza (60, 51, 52).

Il quadro ematologico periferico è caratterizzato da leucocitosi (10-30.000 / mm^3, raramente superiori), non mancano, tuttavia, i casi con numero di leucociti nella norma. La formula leucocitaria è modificata con un aumento delle cellule mononucleate (elementi con aspetto morfologico di linfociti e monociti) che possono raggiungere il 50-80%. L'aspetto e la struttura di queste cellule, in gran parte linfociti T, sono caratteristici per il loro polimorfismo e la loro variabilità tintoriale.

Possono somigliare molto ai linfociti differenziandosi da questi per il citoplasma più abbondante con presenza di vacuoli, mentre il nucleo presenta una struttura cromatinica densa, disposta radialmente. Parte di questi elementi cellulari atipici presenta un maggior volume un nucleo più o meno lobato con fenestrature e piccolo nucleolo.

Queste cellule presentano maggiore somiglianza ai monociti, dai quali però si differenziano, oltre che per la struttura del nucleo, per un citoplasma intensamente basofilo e per l'assenza di granulazioni azzurrofile (foto 1).

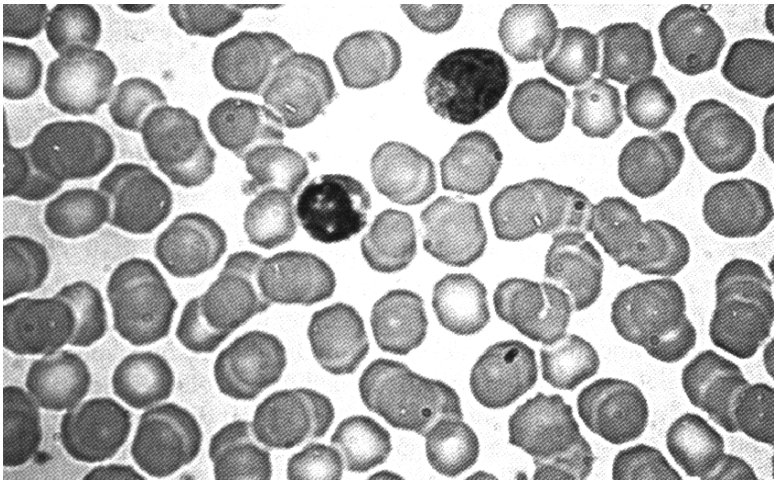


Foto 1. Striscio di sangue periferico: cellule mononucleate in corso di M.N.I.

La variabilità della morfologia di queste cellule è tale da permettere di distinguere tre tipi citologici particolari:

-il primo tipo, il più frequente, di aspetto linfocitario, presenta cellule grandi (12-20 μm) con citoplasma abbondante, francamente basofilo, con un bordo periferico più colorato, nucleo grande, spesso aderente al bordo della cellula, con cromatina disposta a zolle;

-il secondo tipo è costituito da cellule con caratteristiche simil-plasmocitarie;

-il terzo tipo, infine, presenta un aspetto pseudolinfoblastico ma senza presentare caratteri di immaturità; esso può porre problemi di diagnosi differenziale ed essere facilmente confuso con una forma linfoproliferativa; il mielogramma chiarisce ogni eventuale dubbio diagnostico perché presenta un quadro normale. L'aspetto polimorfo sin quì descritto è estremamente indicativo di MNI da indirizzare rapidamente alla diagnosi.

Anatomia patologica: i linfonodi appaiono di volume aumentato e consistenza duro-elastica. Il quadro istologico è quello di una iperplasia linforeticolare aspecifica; i follicoli linfatici marginali sono aumentati e il loro centro molto chiaro (follicoli secondari) contiene numerose cellule reticolari grandi con nucleo dai numerosi nucleoli. Follicoli neoformati si osservano nella polpa centrale, le mitosi sono numerose, l'endotelio dei seni è molto tumefatto mentre la capsula è sempre intatta e la trama di reticolina pressochè normale.

Non vi è mai suppurazione. L'infiltrato di cellule mononucleate normalmente occupa i seni, ampiamente dilatati, ed i cordoni inter-sinusoidali che si estendono nel compartimento interfollicolare, e spesso oscura i centri follicolari.

La colorazione al verde di metilpironina conferma la particolare ricchezza in RNA delle grandi cellule mononucleate.

La milza è spesso aumentata di volume; i suoi follicoli linfoidi sono modestamente iperplasici, i cordoni di Billroth sono ispessiti e contengono non solo linfociti ma anche cellule reticolari e istiociti. Le cellule endoteliali che fanno parte dei seni sono di volume molto grande, l'avventizia delle arteriole e delle venule è infiltrata di cellule mononucleate iperbasofile.

Nel fegato gli spazi portali e i sinusoidi appaiono infiltrati di cellule mononucleate; non è raro riscontrare aree con modesta citolisi (78, 60, 52).

Infezione cronica o persistente: la cronicizzazione o la persistenza dell'infezione da EBV è stata da molti autori associata ad una entità patologica di recente riconoscimento: la sindrome da astenia cronica.

Tale associazione era basata sulla osservazione che, in parte dei soggetti ritenuti affetti da questa malattia, erano riscontrabili titoli anticorpali elevati anti-EA.

Più recentemente, ulteriori studi, hanno negato l'associazione EBV- sindrome da astenia cronica ed è stata rivolta l'attenzione alla presenza del genoma di un altro Herpesvirus, l'HHV6, integrato nel DNA dei linfociti di questi pazienti (60, 74).

Linfoma di Burkitt (BL)

Il linfoma di Burkitt è un tumore di cui si conoscono due forme isomorfe: una forma endemica nell'Africa equatoriale ed una forma sporadica nel resto del mondo.

La forma endemica interessa soggetti nella prima decade di vita, ha prevalente localizzazione alla mandibola, una tipica traslocazione cromosomica (8q-; 14q+) ed è strettamente correlato all'EBV.

Nel BL africano è possibile evidenziare il genoma virale e gli antigeni MA ed EBNA delle cellule tumorali; inoltre studi epidemiologici hanno mostrato che la totalità dei bambini affetti da BL presenta elevati titoli anticorpali contro gli antigeni di EBV.

Il BL africano ha un'incidenza di 15 casi / 100.000 abitanti, colpisce bambini tra i 3 e i 15 anni con incidenza maggiore nel sesso maschile.

E' generalmente un tumore ad origine extralinfonodale che presenta una elevata sensibilità alla terapia con ciclofosfamide (78).

Le caratteristiche epidemiologiche di questa forma e l'ubiquitarietà di EBV hanno fatto ipotizzare la presenza di cofattori nella sua patogenesi.

L'infezione malarica è stata, quindi, identificata come tale in quanto:

a) il BL africano è presente nelle aree geografiche in cui la malaria è endemica;

b) nelle aree in cui la malaria è stata eradicata è diventata trascurabile anche l'incidenza del tumore;

c) tra i soggetti talassemici o con anemia falciforme l'incidenza del BL è bassa rispetto alla popolazione di controllo.

E' stato inoltre dimostrato che durante gli episodi malarici si ha una riduzione dell'attività citotossica dei linfociti T specifici contro EBV (78, 41).

La forma sporadica di BL è presente in tutte le età, con maggiore incidenza tra i soggetti giovani e non ha dimostrato correlazione significativa con l'EBV.

E' un tumore multifocale con interessamento, in particolare, di tiroide, ovaio e retroperitoneo; presenta un andamento clinico più tempestoso rispetto all'altra forma ed una scarsa risposta a trattamenti terapeutici anche aggressivi.

Questa forma ha assunto, nel corso degli ultimi anni, particolare interesse essendo il linfoma più frequente nei soggetti affetti da AIDS.

Istologicamente il BL, in entrambe le sue forme, appare come un linfoma linfoblastico, con cellule di dimensioni medio-grandi, nucleo rotondo con cromatina reticolare e numerosi nucleoli; il citoplasma, sottile, è intensamente basofilo e ricco di vacuoli.

Fra queste cellule sono dispersi istiociti che per il loro citoplasma chiaro conferiscono il classico aspetto a "cielo stellato".

Tra le cellule tumorali sono numerosissime le figure mitotiche. Il BL si presenta, dal punto di vista immunologico, come CD10, CD19, CD22+ e SmIg+ (IgG o IgM / IgD) (78, 74, 29). La diagnosi, semplice per la forma endemica, è comunque basata sempre sull'esame istologico.

Carcinoma Nasofaringeo (NPC)

Il carcinoma nasofaringeo è un tumore maligno delle cellule dell'epitelio squamoso del rinofaringe a prevalente diffusione nella Cina meridionale, raro nelle altre aree geografiche.

La sua associazione con EBV è stata dapprima supposta in base ad indagini siero-epidemiologiche da cui è emerso che la totalità dei pazienti con NPC non differenziato possedevano anticorpi anti-VCA e anti-EA (soprattutto contro il componente D) e possedevano, nel siero e nella saliva, IgA anti-VCA.

Successivamente fu dimostrata la presenza del genoma virale in tutti i campioni bioptici del tumore indifferenziato e rilevata la produzione di EBV trasformante dalle cellule epiteliali maligne del NPC coltivate in vitro.

Nella genesi del NPC alla infezione da EBV è stata associata la presenza di un fattore genetico, in particolare la presenza degli aplotipi HLA A-NSIN2, BW17-AW19, BW17Ablank, e di fattori ambientali quali una dieta ricca di pesce salato e la contaminazione di cibi e suolo con esteri di forbolo (78).

Il NPC origina, generalmente, nella fossetta del Rosenthal nel rinofaringe posteriore. In questa sede l'evidenza clinica del tumore è spesso assente e si evidenzia solo grazie alla rapida diffusione ai linfonodi.

La tumefazione linfonodale è quindi il sintomo di esordio più frequente; sono generalmente coinvolti i linfonodi latero- cervicali superiori, bilateralmente, che si presentano duri e immobili.

Più raramente il tumore può manifestarsi con altra sintomatologia (nasale, auricolare o neurologica) dovuta all'invasione di strutture anatomiche adiacenti.

La diagnosi è essenzialmente istologica nei linfonodi coinvolti; sono descritte tre forme: una forma squamosa ben differenziata e cheratinizzante, una non cheratinizzante e una forma indifferenziata con abbondante infiltrazione linfocitaria associata all'EBV.

La prognosi è infausta; la morte sopraggiunge rapidamente nei casi non trattati ed è spesso dovuta ad ostruzione faringea o laringea.

EBV e Immunodeficienza

Il virus EB come gran parte degli altri virus a DNA, è stato associato a immunodepressione sia per patologie tumorali sia per la riattivazione di infezioni latenti dovute a deficienza dell'immunità cellulo-mediata.

Nella genesi di linfomi Burkitt-like e immunoblastici, nei soggetti infettati da HIV, è stata spesso supposta, anche se non dimostrata, una possibile azione dell'EBV, che, riattivato grazie al difetto dell'attività T-cellulare, porta alla induzione di proliferazione dei linfociti B con alterazione del C-MYC o, più recentemente, nella proliferazione B linfocitaria, dovuta al carico antigenico persistente (viremia da HIV), si ha un'alta percentuale di riarrangiamento genico con un'aumentata probabilità di traslocazione specifica con deregolazione del C-MYC e infezione delle cellule con traslocazione da parte di EBV (60, 41).

I linfomi maligni rappresentano anche una percentuale elevata dei tumori insorti nei soggetti sottoposti a trapianto renale. Circa la metà di questi linfomi possiedono al loro interno il genoma dell'EBV e sono in grado di esprimere gli antigeni nucleari.

La riduzione dell'immunità cellulo-mediata dovuta alle terapie immunosoppressive è la causa di queste patologie; infatti i linfociti B infettati dal virus, in assenza di una reazione immune specifica, proliferano e sono in grado di formare tumori.

Tale supposizione è confermata dalla regressione tumorale, avuta in alcuni casi, con la sospensione della terapia immunosoppressiva (78, 41, 29).

Una immunodeficienza primitiva specificatamente rivolta a EBV è rappresentata dalla sindrome linfoproliferativa associata al cromosoma X, descritta nel 1974 da Purtilo e coll.(69).

Nei soggetti affetti da tale forma non è osservabile una reazione immunitaria cellulo-mediata contro EBV ed essi vanno incontro ad insorgenza di linfomi maligni o a morte per mononucleosi infettiva nel corso dell'infezione primaria.

A parte rari casi sporadici, la malattia colpisce la prole maschile della stessa famiglia, per cui si ritiene che il difetto genetico sia sul cromosoma X.

Il deficit immunitario è dovuto ad una marcata riduzione sia dell'attività citotossica T-cellulare specifica per EBV, sia della attività NK.

La risposta umorale è generalmente normale con alti livelli anticorpali contro VCA ed EA e bassi valori contro EBNA, profilo anticorpale presente in tutte le infezioni da EBV nei soggetti immunodeficienti.

Le femmine portatrici del difetto genetico possiedono una normale attività T-cellulare (69).

Linfomi associati all'EBV sono stati descritti anche in altre immunodeficienze quali la sindrome di Wiskott-Aldrich, i trapiantati cardiaci e l'atassia-teleangectasia (78).

Diagnosi

Diagnosi clinica

Poiché le infezioni da EBV possono coinvolgere molti sistemi organici, la diagnosi clinica differenziale è spesso difficile.

La diagnosi clinica di mononucleosi infettiva di solito si basa sulla terna faringite, linfocitosi con linfociti atipici e presenza di anticorpi eterofili.

La mononucleosi deve essere distinta da molte altre malattie infettive: sindrome simil-mononucleosica, infatti, può essere causata da Citomegalovirus, Herpes simplex, Rubeovirus, Adenovirus e dal Toxoplasma gondii.

Quando il coinvolgimento del fegato è preminente, la mononucleosi può sembrare una epatite, e quando la polmonite è l'elemento principale, come accade nei bambini, devono essere esclusi numerosi agenti eziologici.

Le sindromi linfoproliferative maligne e quelle associate ad anemia emolitica, trombocitopenia e neutropenia possono essere confuse con leucemia acuta.

Il BL deve essere distinto da altri disturbi linfoproliferativi maligni sulla base istologica.

La diagnosi del carcinoma naso faringeo si basa sullo studio del materiale patologico: può essere confuso con altri neoplasmi cellulari desquamanti che sorgono sulla testa e sul collo.

Diagnosi di laboratorio

La diagnosi di laboratorio di una infezione da EBV si basa su due principi generali. Il primo è la dimostrazione del virus, dell'antigene virale o del DNA virale; il secondo è la ricerca degli anticorpi sierici.

Dimostrazione del virus

Il virus biologicamente attivo può essere isolato dalla saliva, dal sangue periferico o dal tessuto linfoide utilizzando la sua capacità di immortalare i linfociti umani coltivati. Questo tipo di ricerca richiede tempo (6-8 settimane) ed attrezzature specifiche per colture cellulari, attrezzature non sempre disponibili nei comuni laboratori; inoltre è

teoricamente capace di rilevare EBV infettivo nella gola o nel sangue di alcuni individui sieropositivi nei quali il virus persiste o è riattivato, cosa che limita il suo uso come utilità diagnostica.

Ricerca antigeni

L'antigene nucleare virale indicatore della latenza del virus può essere trovato in tessuti linfoidi, nei tessuti dell'NPC e occasionalmente nel sangue periferico.

Durante la fase acuta della MI circa l'1% (o meno) dei linfociti del sangue periferico contiene un EBNA. Nella malattia linfoproliferativa in soggetti immunodeficienti i prodotti del ciclo latente vengono determinati ed evidenziati in cellule immortalate in vitro.

Nel BL l'EBNA-1, che si riscontra anche nel NPC, è l'unico elemento invariabile.

La ricerca della presenza di EBNA nei tessuti eseguita con la tecnica della immunofluorescenza, è limitata dalla interpretazione soggettiva e dalla indisponibilità di anticorpi monospecifici ai differenti componenti del complesso antigene.

La dimostrazione del DNA virale

La ibridizzazione dell'acido nucleico è la tecnica più specifica per dimostrare il DNA virale nei campioni clinici; rivela ambedue i virioni, infettivo e non infettivo, e le varianti non trasformanti di EBV.

Il recente sviluppo delle tecniche per preparare grande quantità di frammenti clonati di DNA virale nei plasmidi chimerici ha reso possibile preparare probes virali in grande quantità permettendo per questo studi di una grande quantità di campioni.

Queste tecniche sono state applicate allo studio di escrezioni di EBV nelle secrezioni orofaringee di pazienti con MI e individui asintomatici sieropositivi e nell'esame di campioni di tessuto da pazienti con malattia linfoproliferativa ritenuta associata ad EBV (3, 4, 13).

Sono stati usati probes preparati da quattro differenti regioni del genoma di EBV (Eco RI B e C, e Bam HI K e W) e tutti sono riusciti ad evidenziare l'acido nucleico virale nei campioni biologici.

Possono essere preparati probes da altri plasmidi ricombinanti contenenti il frammento desiderato (minilisato) o dal frammento purificato separato dal plasmide.

Generalmente si ritiene ottimale la preparazione di probes da 50-100 ng di DNA plasmidico, quando questi probes contengono 2-3x10^7 cpm totali di P32 con radioattività specifica di 2-3x10^8 cpm x μg.

La ibridizzazione dell'acido nucleico può rivelare 1-10 pg di omologo DNA, 100-1000 cellule Raji (ciascuna contenente approssimativamente 60 copie genomiche per cellula) o 10^4 - 10^5 copie di genoma EBV.

Vengono utilizzate due tecniche generali:

1) *Southern ibridizzazione* che è capace di distinguere le porzioni specifiche del DNA di EBV presenti nella lesione;

2) *ibridizzazione in situ*, che identifica le cellule che contengono DNA di EBV.

Southern ibridizzazione: la Southern ibridizzazione è stata usata per provare l'associazione fra EBV e il gruppo di disordini linfoproliferativi e neoplasmi linfoidi ritenuti associati con il virus.

L'interpretazione dei risultati ottenuti con tale analisi è considerevolmente semplificata perché il probe detiene un frammento di DNA di dimensioni approssimativamente uguale al frammento del DNA del virione.

Pertanto la possibile informazione sbagliata dei risultati, che si potrebbe avere a causa di una non specifica ibridizzazione di una mistura di acidi cellulari e virali, è eliminata dalla natura altamente specifica dei risultati prodotti dalla Southern ibridizzazione.

La sensibilità della Southern ibridizzazione, nelle migliori condizioni, è una copia di genoma EBV per 10 cellule, più frequentemente 1 copia per cellula.

Questa sensibilità è sufficiente per determinare DNA di EBV nel NPC, nel BL e linfomi policlonali, in quanto tutti contengono molte copie di DNA virale in ogni cellula; non è abbastanza sensibile per determinare DNA virale nel sangue periferico di pazienti con MI.

La Southern ibridizzazione può essere usata come rapida titolazione della secrezione salivare di EBV.

Ibridizzazione in situ: dal momento che EBV è precocemente ritrovato nella saliva di molti individui malati e da soggetti per lo più immunosoppressi, si è a lungo ritenuto che le cellule "permissive" dell'infezione da EBV siano presenti nell'orofaringe.

Sebbene la cellula B sia il principale target dell'infezione, essa non è produttiva di una progenie di virus e pertanto è stato cercato un altro tipo di cellula capace di supportare l'intero ciclo riproduttivo.

E' ormai evidente che le cellule epiteliali umane possono essere infettate dal virus, con conseguente espressione di ambedue gli antigeni replicativi e nucleare (68, 63).

E' stato anche dimostrato che EBV può essere trovato nelle ghiandole parotidi e nelle cellule esfoliative dell'orofaringe durante la MI (46, 35).

Inoltre, usando la citoibridizzazione in situ, nelle cellule epiteliali orofaringee è stato trovato sia DNA che m-RNA di EBV (65).

In circa il 60% dei casi, i risultati della citoibridizzazione e le colture per virus infettivo extracellulare sono in accordo, ma in altri casi la citoibridizzazione rivela DNA di EBV in assenza di virus extracellulare rivelabile.

I dati indicano che la replicazione virale attiva avviene all'interno delle cellule epiteliali, che i nuclei cellulari sono il luogo della replicazione virale, e che la produzione virale delle cellule epitaliali può aumentare al momento della desquamazione e morte della cellula.

Ricerca degli anticorpi

I tests sierologici sono un valido aiuto per la diagnosi delle infezioni da EBV in quanto un elevato numero di casi non presenta i classici criteri necessari per effettuare la diagnosi clinica.

Per definire lo stato immunitario e per conoscere lo stadio della malattia, vengono perciò utilizzati specifici pannelli per determinare e titolare gli anticorpi contro i diversi antigeni virali.

- *Anticorpi eterofili.* Nel siero del paziente con MI sono presenti anticorpi con attività agglutinante nei confronti di globuli rossi di montone, cavallo e bue.

Questi anticorpi eterofili appartengono alla classe immunoglobulinica IgM e possono essere messi in evidenza con la reazione di Paul Bunnel

Si innalzano 2-3 settimane dopo l'inizio della malattia e persistono a titoli elevati per circa 3 mesi e generalmente scompaiono dopo 6 mesi. (Fig 3). Titoli più alti e permanenza per più lungo tempo durante la convalescenza non sono in correlazione con la gravità della malattia. L'assenza di anticorpi eterofili si può riscontrare nel 10-20 % degli adulti con MI; i bambini sono meno capaci di sviluppare anticorpi eterofili nel corso della infezione primaria e, quando lo fanno, il titolo è generalmente più basso che negli adolescenti e negli adulti.

-*Anticorpi anti-VCA.* Entro 4-7 giorni dalla comparsa dei sintomi di MI compaiono anticorpi contro il VCA.

VCA IgM e VCA IgG vengono prodotti contemporaneamente durante la fase acuta.

Gli anticorpi VCA IgM, la cui presenza normalmente indica una infezione acuta o recente, scompaiono dopo 6-12 settimane, mentre gli anticorpi VCA IgG raggiungono il massimo valore e persistono a questi livelli per molti mesi per poi diminuire e rimanere presenti per tutta la vita (Fig. 4).

La determinazione degli anticorpi anti-VCA tradizionalmente è eseguita utilizzando tecniche di immunofluorescenza indiretta (IFA) (foto 2). Attualmente, per ovviare alla laboriosità, alla soggettività della lettura e alla sensibilità, vengono utilizzati sistemi ELISA che riescono a valutare livelli molto bassi di anticorpi e, permettendo una valutazione quantitativa dei risultati, facilitano il monitoraggio degli anticorpi durante il corso della malattia.

-*Anticorpi anti-EBNA*. Gli anticorpi IgM anti-EBNA possono essere ritrovati 3-6 giorni dopo la comparsa dei segni clinici della malattia e scompaiono durante la convalescenza, mentre gli anticorpi IgG mostrano un aumento durante la convalescenza e possono persistere per tutta la vita (Fig. 5).

Per la determinazione degli anti-EBNA è stata usata inizialmente la anticomplemento immunofluorescenza (ACIF) e l'IFA.

Questi metodi sono poco utili per determinare lo stato della malattia in quanto risultati positivi non identificano una infezione in atto e risultati negativi non sono conclusivi in quanto non distinguono lo stato di recettività della malattia dallo stato di fase acuta.

Più recentemente, l'introduzione di sistemi ELISA ha permesso la determinazione quantitativa dei livelli anticorpali di EBNA IgG ed EBNA IgM.

La comparazione di tali livelli ha notevole significato diagnostico nel distinguere la fase acuta dalla fase di convalescenza; pazienti con livelli EBNA IgM più elevati degli EBNA IgG possono essere considerati in fase di malattia acuta, mentre pazienti con livelli EBNA IgG più elevati di quelli EBNA IgM possono essere considerati in una fase di malattia pregressa.

¬*Anticorpi anti-EA*. Gli anticorpi anti-EA sono raramente presenti nei portatori sani del virus, ma sono frequentemente ritrovati nei pazienti con malattie EBV-correlate.

Nella MI circa l'85% dei pazienti, durante l'infezione primaria, presenta un titolo significativo per il componente D dell'EA; gli anticorpi anti-EA(D) normalmente compaiono durante la fase acuta e possono permanere nella fase di convalescenza (Fig. 6)

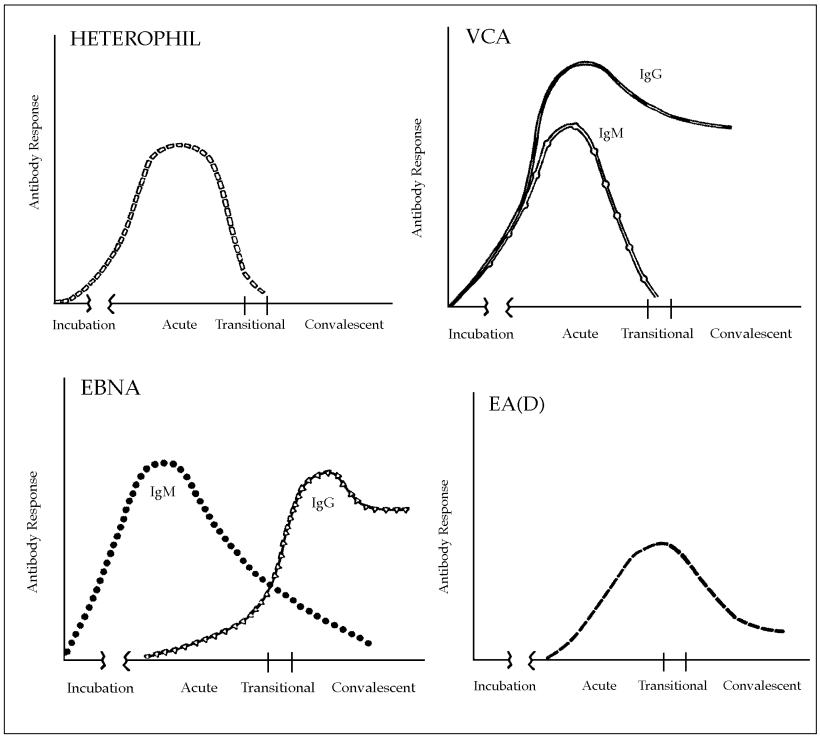


Figure 3, 4, 5 e 6. Andamento degli anticorpi eterofili (3), anti-VCA (4), anti-EBNA (5), anti-EA (D) (6).

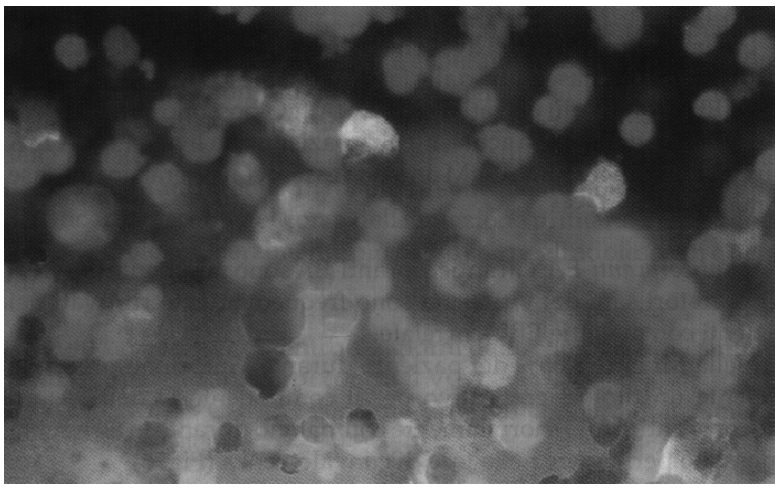


Foto 2. Anticorpi anti-VCA in I.F.I.

Soltanto una piccola percentuale di pazienti con MI presenta un EA(R) da solo o uno dopo la diminuzione del componente D. Un alto titolo di anti-EA (R) è attribuibile solo ai casi di BL.

La riattivazione di una infezione da EBV è di solito accompagnata da un aumento del titolo anticorpale di EA(D) o EA(R).

La Fig. 7 riassume l'andamento anticorpale nelle varie fasi della malattia.

La determinazione qualitativa e quantitativa degli anticorpi serici permette la realizzazione di profili sierologici caratteristici (Tab. 1).

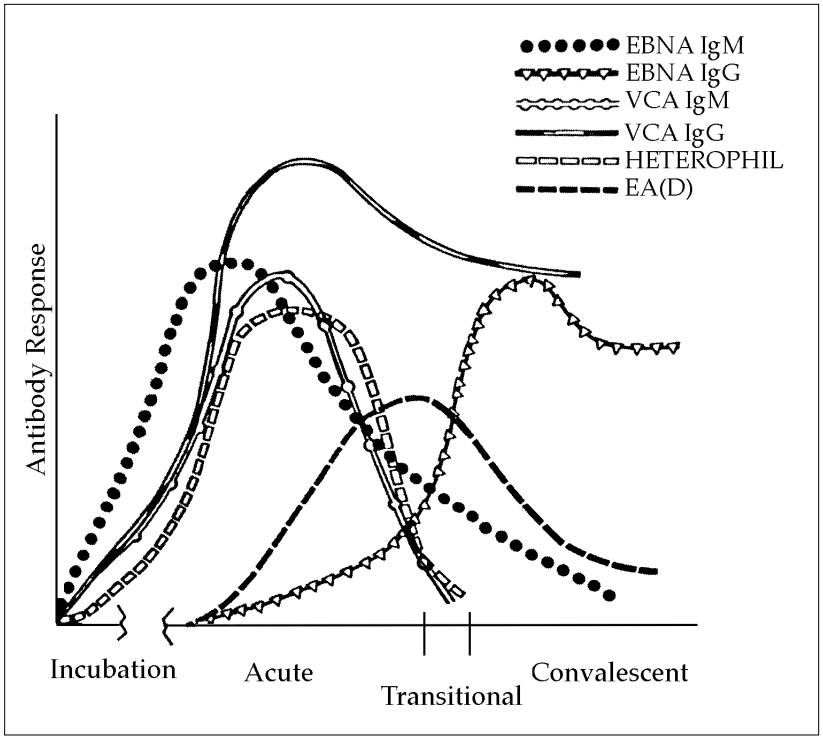


Figura 7. Andamento riepilogativo degli anticorpi anti-EBV.

	VCA IgM	VCA IgG	EA-D	EA-R	EBNA IgM	EBNA IgG
Sieronegatività	-	-	-	-	-	-
Infezione acuta	v	+++	+	-	+	-
Infezione pregressa	-	v	-	-	-	v
Infezione cronica o riattivazione	-	+++	+++	-	-	+
NPC (EBV associato)	-	+++	+++	-	-	+
BL (EBV associato)	-	+++	-	+++	-	+
Infez.in immunodeficienti	-	+++	+++	-	-	+

Legenda:
- =Negativo
+ =Basso titolo
+++ =Alto titolo
v =Titolo variabile

Tabella 1. Profili sierologici.

Terapia

Farmaci antivirali

Numerosi farmaci antivirali hanno presentato, in vitro, un parziale effetto inibente sulla replicazione del virus, ma nessuno ha una reale efficacia terapeutica.

Gli agenti più studiati sono stati α-Interferone umano e l'acyclovir (acycloguanosina). Il primo, di origine leucocitaria, inibisce la sintesi di DNA cellulare nelle cellule infettate e in uno studio su soggetti sottoposti a trapianto renale si è avuto una escrezione del virus nel 38% dei pazienti trattati con α-Interferone contro il 65% del gruppo di controllo.

L'acyclovir agisce solo sulla fase litica del ciclo virale, blocca la sintesi del DNA di EBV nella sua forma lineare, ma non ha nessun effetto sul DNA in forma circolare del virus in fase di latenza. L'acyclovir inibisce la DNA polimerasi virale, tuttavia la replicazione virale riprende dopo la sospensione del trattamento (39).

Trattamento della MI

La terapia della MI è sintomatica, di supporto.

La faringodinia conseguente alla flogosi è normalmente trattata con comuni analgesici; l'uso di antibiotici è giustificato nei casi con infezione faringea secondaria da Streptococco β emolitico gr.A: in questi casi è bene non usare l'ampicillina che, in questi pazienti, causa generalmente un rash cutaneo (39). Alcuni AA raccomandano l'uso di corticosteroidi in tutti i casi di MI per la conseguente riduzione di severità e durata della malattia, ma numerosi altri ritengono che il trattamento corticosteroideo debba essere riservato ai casi complicati da ostruzioni faringo-tracheali o da anemia emolitica autoimmune o da neuropatie (39, 78).

Trattamento del BL

Il trattamento d'elezione del BL è rappresentato dalla chemioterapia sistemica.

La radioterapia e la chirurgia sono usate in aggiunta per ridurre la massa tumorale.

Il protocollo terapeutico generalmente usato consiste in sei dosi di 40 mg/Kg di ciclofosfamide ad intervalli periodici, ogni 15-20 giorni. Molti protocolli includono anche altri chemioterapici quali vincristina, metotrexate e prednisolone (39). Il BL endemico, legato ad EBV, presenta una eccellente risposta alla chemioterapia con l'80-90% di remissione; il linfoma sporadico EBV negativo è invece scarsamente sensibile alla terapia (39, 78).

Trattamento del NPC

Consiste nella combinazione del trattamento radioterapico e del trattamento chirurgico.

La prognosi è legata alla precocità dell'intervento terapeutico; i tumori confinati al rinofaringe presentano una sopravvivenza a 5 anni di circa l'80%, mentre nelle forme con interessamento dei linfonodi laterocervicali o sovraclaveari essa scende al di sotto del 20% (39).

Vaccinazioni

Attualmente nessun vaccino anti-EBV è disponibile per l'uso umano.

Un vaccino derivante da una glicoproteina ad alto peso molecolare (gp 340), costituente dell'MA è stato sviluppato e provato nei tassarini.

In questi animali si è avuto il 100% di effetto protettivo contro dosi linfomatogene di EBV. E' attualmente allo studio la possibilità di utilizzare tale vaccinazione sull'uomo nelle zone endemiche per il BL e il NPC.(39, 14, 78).

Bibliografia

1) Adams A.: Replication of latent Epstein-Barr genomes in Raji cells. J. Virol. 1987: 61:1743-1746.

2) Adams A., Lindahl T.: Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1975; 72: 1477-1481.

3) Andiman W., Gradoville L., Heston L. et al.: Use of cloned probes to detect Epstein-Barr viral DNA in tissues of patients with neoplastic and lymphoproliferative diseases. J.Infect. Dis. 1983; 148: 967-977.

4) Andiman W., Eastman R., Niederman J.: Analysis of EBV virus shedding patterns using nucleic acid hybridization (abstract). Washington, DC: Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1984.

5) Brown N.A., Miller G.: Immunoglobulin expression by human B lymphocites clonally transformed by Epstein-Barr virus. J. Immunol. 1982; 128: 24- 29.

6) Brown N.A., Liu C., Berenson J.R., Garcia C.R., Wang R., Calame K.L.: Immunoglobulin JH, Cu, and C ygene rearrangements in human B lymphocytes clonally transformed by Epstein-Barr virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82: 556-560.

7) Burkitt D.: A sarcoma involving the Jaws in African children. Br. J. Surg. 1958; 46: 218-223.

8) Burkitt D.: Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. Br. Med. J. 1962; 2: 1019-1023.

9) Calender A., Billaud M., Aubry J.P., Bauchereau J., Vuillaume M., Lenoir G.M.: Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987; 84: 8060-8064.

10) Chevallier-Greco A., Manet E., Chavrier P., Mosnier C., Daillie J., Sergeant A.: Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors.EB1 and EB2 are required to activate transcription from an EBV early promoter. EMBO J. 1986; 5: 3243-3249.

11) Countryman J., Miller G.: Activation of expression of latent Epstein- Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82: 4085-4089.

12) Dambaugh T., Beisel C., Hummel M. et al.: Epstein-Barr virus(B95-8) DNA.VII.Molecular cloning and detailed mapping. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980; 77: 2999-3003.

13) Diaz-Mitoma F., Preiksaitis J.K., Leung W.C., Tyrrel D.L.: DNA-DNA dot hybridization to detect Epstein-Barr virus in throat washing. J. Infect. Dis. 1987; 155: 297-303.

14) Epstein M.A.: Vaccination against Epstein-Barr virus: current progres and future strategies.Lancet 1986; 7: 1425-1427.

15) Epstein M.A., Achong B.G., Barr Y.M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. Lancet 1964; 1: 702-703.

16) Epstein M.A., Barr Y.M.: Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma.Lancet 1964; 1: 252-253.

17) Gerber P., Monroe J.H.: Studies on leukocytes growing in continuous colture derived from normal human donors. J. Natl. Cancer Inst. 1968; 40: 855-866.

18) Gergely L., Luka J., Klein G.: Interaction between Epstein-Barr virus determined nuclear antigen (EBNA) and the viral DNA. J. Gen. Virol. 1984; 65: 2043-2048.

19) Gregory C.D., Kirckgens C., Edwards C.F. et al.: Epstein-Barr virus transformed human precursor B cell lines: altered growth phenotype of lines with germline or rerranged bat nonexpressed heavy chain genes. Eur. J. Immunol. 1987; 17: 1199-1207.

20) Grogan E., Jenson H., Countryman J., Heston L., Gradoville L., Miller G.: Transfaction of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr virus infection to productive infection in lymphoid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987; 84: 1332- 1336.

21) Henderson A., Ripley S., Heller M., Kieff E.: Chromosome site for Epstein- Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth trasformed in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983; 80: 1987- 1991.

22) Henderson E., Heston L., Grogan E., Miller G.: Radiobiological inactivation of Epstein-Barr virus. J. Virol. 1978; 25: 51-59.

23) Henle G., Henle W.: Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. J. Bacteriol. 1966; 91: 1248-1256.

24) Henle G., Henle W., Lennette E.: Il virus di Epstein-Barr. Le Scienze 133, Settembre 1979.

25) Henle G., Henle W., Diehl V.: Relation of Burkitt's tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. Proc. Matl. Acad. Sci. USA 1968; 59: 94-101.

26) Henle W., Henle G., Zajac B.A., Pearson G., Waubke R., Sriba M.: Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein- Barr virus. Science 1970; 169: 188-190.

27) Henle G., Henle W., Klein G.: Demonstration of two distinct components in the early antigen complex of Epstein-Barr virus-infected cells. Int. J. Cancer 1971; 8: 272-282.

28) Henle W., Diehl V., Kohn G., zur Hausen H., Henle G.: Herpes type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. Science 1967; 157: 1064-1065.

29) Ho M. et al.: The frequency of Epstein-Barr virus infection and associated lymphoproliferative syndrome after transplantation and its manifestation in children.Transplantation, 1988; 45: 719-727.

30) Kallin B., Dillner J., Ernberg I. et al.: Four virally determined nuclear antigens are expressed in Epstein-Barr virus transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83: 1499-1503.

31) Kief E., Liebowitz D.: EBV virus and its replication. In Fields N. Virology, 67, NY 1980.

32) King W., Van Santen V., Kief E.: Epstein-Barr virus RNA.VI.Viral RNA in restringently and abortively infected Raji cells. J. Virol. 1981; 38: 649-660.

33) Kinter C., Sugden B.: Conservation and progressive methylation of Epstein-Barr viral DNA sequences in transformed cells. J. Virol. 1981; 38: 305-316.

34) Kinter C., Sugden B.: Identification of antigenic determinants unique to the surface of cells transformed by Epstein-Barr virus. Nature 1981; 294: 458-460.

35) Lemon S.M., Hutt L.M., Shaw J.Li J-LH, Pagano J.: Replication EBV in epithelial cells during infectious mononucleosis. Nature 1977; 268: 268-270.

36) Litler E., Zeuthen J., McBride A.A. et al.: Identification of an Epstein- Barr virus-coded thymidine kinase. EMBO J 1986; 5: 1959-1966.

37) Mark W., Sugden B.: Transformation of lymphocytes by Epstein-Barr virus requires only one-fourth of the viral genome.Virology 1982; 122: 431-443.

38) Matsuo T., Heller M., Petti L., O'Shiro E., Kieff E.: Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. Science 1984; 226: 1322-1325.

39) Miller G.: Epstein-Barr virus.Biology, pathogenesis and medical aspects.Virology 1990; 68: 1921-1953.

40) Mille G.: Human lymphoblastoid cell lines and Epstein-Barr virus (a review of their interrelationships and their relevance to the etiology of leukoproliferative states in man).Yale J. Biol. Med. 1971; 43: 358-384.

41) Miller G.: Epstein-Barr virus. In Fields B.N. Virology. Raven Press, NY 1985.

42) Miller G., Enders J.F., Lisco H., Kohn HI.: Establishment of lines from normal human blood leukocytes by co-cultivation with a leukocyte line derived from a leukemic child. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1969; 132: 247-252.

43) Miller G., Shope T., Lisco H., Stitt D., Lipman M.: Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes and viral antigens in squirrel, monkey and marmoset leukocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1972; 69: 383- 387.

44) Miller G., Lisco H., Kohn H.I., Stitt D.: Establishment of cell lines from normal adult human blood leukocytes bya exposure to Epstein-Barr virus and neutralization by human sera with Epstein-Barr virus antibody. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1971; 137: 1459-1465.

45) Miller N., Hutt-Fletcher D.M.: A monoclonal antibody to glycoprotein gp85 inhibits fusion but not attachment to Epstein-Barr virus. J. Virol. 1988; 62: 2366-2372.

46) Morgan D.G., Niederman J.C., Miller G., Smith H.W., Dowaliby J.M.: Site of Epstein-Barr virus replication in the oropharynx. Lancet 1979; 2: 1154-7

47) Moss D.J., Sculley T.B., Pope J.H.: Induction of Epstein-Barr virus nuclear antigens. J. Virol. 1986; 58: 988-990.

48) Nonovama M., Huang C.H., Pagano I.S., Klein G., Singh S.: DNA of Epstein-Barr virus tetected in tissue of Birkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1973; 70: 3265-3268.

49) North J.A., Morgan A.J., Epstein M.A.: Observations on the EB virus envelope and virus-determined membrane antigen (MA) polypeptides. Int. J. Cancer 1980; 26: 231-240.

50) North J.R., Morgan A.J., Thompson J.L., Epstein M.A.: Purified Epstein-Barr virus M.340000 glycoprotein induces potent virus-

neutralizing antibodies when incorporated in liposomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982; 79: 7504-7508.

51) Ortona L., Tumbarello M., Cauda R.: Il virus di Epstein-Barr e la mononucleosi infettiva. Aggiornamento del medico 12, 9, 1988.

52) Ortona L., Federico G.: La mononucleosi infettiva. In Sorice F, Ortona L. Malattie infettive UTET, Torino, 1985.

53) Pope J.H., Scott W., Mik H.: Identification of the filterable leukocyte transforming factor of QIMR-WIL cells as herpes-like virus. Int. J. Cancer 1969; 4: 255-260.

54) Pulvertaft RJV.: Cytology of Burkitt's tumor (African lymphoma) Lancet 1964; 1: 238-240.

55) Reedman B.M., Klein G.: Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non- producer lymphoblastoid cell lines. Int. J. Cancer 1973; 11: 499-520.

56) Robinson J., Smith D.: Infection of human B lymphocytes with high multiplicities of Epstein-Barr virus: kinetics of EBNA expression, cellular DNA synthesis and mitosis.Virology 1981; 109: 336-343.

57) Rooney C., Howe J.G., Speck S.H., Miller G.: Influences of Burkitt's lymphoma and primary B cells on latent gene expression by the non- immortalizing P31-HR-1 strain of Epstein-Barr virus. J. Virol. 1989; 63: 1531-1539.

58) Rowe D.T., Heston L., Metlay J., Miller G.: Identification and expression of a nuclear antigen from the genomic region of the Jijoyi strain of Epstein-Barr virus which is missing in its non-immortalizing deletion mutant P3HR-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82: 7429-7433.

59) Rowe D.T., Farrell P.J., Miller G.: Novel nuclear antigens recognized by human sera in lymphocytes latently infected by Epstein-Barr virus. Virology 1987; 156: 153-162.

60) Schooley R.T., Dolin R.: Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. In Mandell, Douglas, Bernett.Principles and pratice of infectious desease, 3rd Edition. Churchill Livingston Inc., NY, 1990.

61) Sculley D.G., Sculley T.B., Pope J.H.: Reactions of sera from patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and infectious mononucleosis to Epstein-Barr virus-induced polypeptides. J. Gen. Virol. 1986; 67: 2253-2258.

62) Sculley T.B., Walker P.J., Moss D.J., Pope JH.: Identification of multiple Epstein-Barr virus-induced nuclear antigens with sera from patients with rheumatoid arthritis. J. Virol. 1984; 52: 88-93.

63) Shapiro I.M., Volsky D.J.: Infection of normal human epithelial cells by Epstein-Barr virus. Science 1983; 219: 1225-8.

64) Shaw J.E., Levinger L.F., Carter C.W. Jr.: Nucleosomal structure of Epstein- Barr virus DNA in transformed cell lines. J. Virol. 1979; 29: 657-665.

65) Sixbey J.W., Vesterinen E.H., Nedrud J.G., Raab-Traub N., Walton L.A., Pagano J.S.: Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. Nature (London) 1983; 306: 480-3.

66) Skare J., Strominger J.L.: Cloning and mapping of Bam HI endonuclease fragments of DNA from the transforming B95-8 strain of Epstein- Barr virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980; 77: 3860-3864.

67) Speck S.H., Strominger J.L.: Analysis of the transcripts encoding the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen 1.A potentially polycistronic message generated by long-range splicing of several exons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82: 8305-8309.

68) Stoerker J., Parris D., Yajima Y., Glaser R.: Pleiotropic expression of Epstein-Barr virus DNA in human epithelia cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981; 78: 5852-5.

69) Sullivan J.L., Byron K.S., Brenster G.E., Purtilo DT.: X-linked lymphoproliferative syndrome: natural history of the immunodeficiency. J. Clin. Invest. 71: 1765-1983.

70) Takada K., Shimizu V., Sakuma S., Ono Y.: Trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. J. Virol. 1986; 57: 1016-1022.

71) Thorley-Lawson D.A., Edson C.N.: Polypeptides of Epstein-Barr virus membrane antigen complex. J. Virol. 1979; 32: 458-467.

72) Thorley-Lawson D.A, Nadlet I.M., Bhan A.K., Schooley R.T.: Blast-2 (EBVCS), an early cell surface marker of human B cell activation is superinduced by Epstein-Barr virus. J. Immunol. 1985; 134: 3007-3012.

73) Thorley-Lawson D.A., Schooley R.T., Bhan A.K., Nadler L.M.: Epstein-Barr virus superinduces a new human B cell differentiation antigen (B-LAST 1) expressed on transformed lymphoblasts. Cell. 1982; 30: 415-425.

74) Tosato G., Straus S., Helce W., Pike S.E., Blease R.M.: Charecteristic T cell disfunction in patients with chronic active Epstein-Barr virus infection (chronic infectious mononucleosis). J. Immunol. 1985; 134: 3092.

75) Trumper P.A., Epstein M.A., Giovanella B.C., Finerty S.: Isolation of infectious EB virus from the epithelia tumor cells of nasopharyngeal carcinoma. Int. J. Cancer 1977; 20: 655-662.

76) Wang P., Petti L., Braun D., Seung S., Kieff E.: A bicistronic Epstein-Barr virus mRNA encodes two nuclear proteins in latently infected, growth-transformed lymphocytes. J. Virol. 1987; 61: 945-954.

77) Wilson G., Miller G.: Recovery of Epstein-Barr virus from nonproducer neonatal human lymphoid cell transformants. Virology 1979; 95: 351- 358.

78) Zuckerman A.J., Banatvala J.E., Pattison J.R.: Il virus di Epstein-Barr in Virologia clinica 111-132.

79) zur Hausen H., Schulte-Holthausen H., Klein G. et al.: EB-virus DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature 1970; 228: 1056-1057.

Indice

Editoriale..... pag. 3
Storia..... » 5
Struttura ..... » 7
Sistemi antigene ..... » 9
Antigene nucleare (EBNA) ..... » 9
Antigene di membrana rivelato dai linfociti (LYDMA) ..... » 10
Antigene di membrana (MA) ..... » 10
Antigene precoce (EA) ..... » 10
Antigene virocapsidico (VCA) ..... » 11
Ciclo biologico..... » 12
Immortalizzazione dei linfociti ..... » 13
Conversione ..... » 15
Latenza..... » 16
Patologia..... » 19
Mononucleosi infettiva (MI)..... » 19
Linfoma di Burkitt (BL) ..... » 22
Carcinoma nasofaringeo (NPC) ..... » 24
EBV e immunodeficienza..... » 25
Diagnosi ..... » 27
Diagnosi clinica ..... » 27
Diagnosi di laboratorio..... » 27
Terapia..... » 35
Farmaci antivirali ..... » 35
Trattamento della MI..... » 35
Trattamento della BL ..... » 35
Trattamento del NPC..... » 36
Vaccinazioni ..... » 36
Bibliografia..... » 37
Indice ..... » 45

Collana Caleidoscopio - Ed. Italiana

MEDICAL SYSTEMS S.P.A.

....IL FUTURO HA IL CUORE ANTICO

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'obesita'.*** **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 enzimoimmunologico ed fluoroimmunologico.*** **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 coriogonadotropina 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. Biordi L. Martinotti S.: ***Gli Oncogèni*****. 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., Besaglia 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.: ***Ipertensione 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 lnfociti B*****. Febbraio '94.**
87. Rossetti R.: ***Gli streptoccocchi beta emolitici di gruppo (SGB)*****. Marzo '94.**
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: ***Marcatori 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 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.**

Ad ogni passo nasce un pensiero!!!!!

Abbiamo una esperienza ultradecennale.
Abbiamo pubblicato riviste in italiano, inglese, francese, spagnolo, albanese...
Abbiamo distribuito le nostre riviste in tutto il mondo: dalle Americhe all'Australia, dall'Europa alla Cina, dall'Africa alla Confederazione degli Stati Indipendenti.

MEDICAL SYSTEMS S.P.A.

....IL FUTURO HA IL CUORE ANTICO

Editor in Chief: Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel. e Fax 079 270464
Amministrazione: Medical Systems S.p.A.
Via Rio Torbido, 40 - 16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 8 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 803498- 809070.

EDITORE

Abbiamo deciso di mettere a Vostra disposizione la nostra esperienza, la nostra passione, le nostre tecnologie per la pubblicazione di Atti di Congressi, per la ideazione e realizzazione di riviste scientifiche, per la pubblicazione di libri e monografie, per la raccolta e stampa di articoli scientifici.....

Consultateci!!!!!!

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 13, numero 93

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464

Responsabile Commerciale
Alessandra Pater

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti
Fina Grandeppieno
Flavio Damarciasi

Editore
MEDICAL SYSTEMS S.P.A.

....IL FUTURO HA IL CUORE ANTICO

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 801005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 809737- 809070.
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Español, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Caleidoscopio literario, Pandora, Tribuna Biologica e Medica, 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 Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Marzo 1995
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)

Per una completa diagnostica dell'EBV:

Linea IFA STELLAR

Serie: Mosaici Romani (Leptis Magna - Villa del Nilo)

Invan si pesca se l'amo non ha esca

EBV VCA IgG cod. ST1004-1
EBV VCAIgM cod. ST1004-6
EBV NA IgG cod. ST1007-1
EBV EA IgG cod. ST1008-1

- Reattivi pronti all'uso
- Procedura analoga per tutti i kit

Tutti i kit sono completi di controlli positivo e negativo, 2 fiale di coniugato, soluzione di montaggio, PBS e cartine assorbenti per i vetrini; 12 vetrini da 10 pozzetti ciascuno.

- Linea completa di kits in IFA: Toxoplasma, Rosolia, CMV, HSV1, HSV2, EBV, Varicella, Morbillo, Parotite, Clamidia, RSV, Herpes-6.

MEDICAL SYSTEMS S.p.A.

IL FUTURO HA IL CUORE ANTICO

MEDICAL SYSTEMS S.p.A. - 16163 GENOVA STRUPPA - ITALY - Via Rio Torbido, 40 - Tel. 010/83401 - 808051 r.a. - Telefax 010/804661