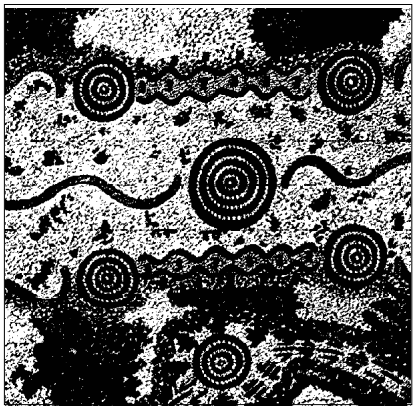
Caleidoscopio

Italiano



Maria Grazia Marin
Susanna Bresciani
Cinzia Mazza
Alberto Albertini
Elisabetta Cariani

Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani

Cattedra di Chimica Applicata alle Scienze Biomediche
Università di Brescia - III Laboratorio Analisi
Ospedale di Brescia

97

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 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 mercato diagnostico è sicuramente dominato dalla biochimica clinica che, su stima mondiale, costituisce quasi la metà del totale. Seconde, in questa classifica, troviamo le metodiche per la diagnostica delle malattie infettive nelle quali l'Italia si colloca nelle prime posizioni tra i paesi dell'Europa occidentale.

Se entriamo nel dettaglio vediamo che il mercato italiano per la diagnostica della infezione da retrovirus umani può essere stimato, per il 1994, in circa 60 miliardi, secondo solo a quello delle epatiti virali, ed in questo settore il contributo delle biotecnologie è stato fondamentale investendo sia i tests di screening con metodica ELISA, che rappresentano da soli circa il 65% di tutti i tests per i retrovirus, sia tecniche più sofisticate di ricerca con sonde genetiche. Pertanto, la profonda conoscenza di queste metodiche risulta di estrema importanza e questa monografia ci guida alla loro analisi sistematica in modo semplice, chiaro ed accessibile anche ai lettori che non operano direttamente nel settore.

Infatti è strutturata in una prima parte relativa alle tecniche biotecnologiche correntemente utilizzate, o di potenziale utilità futura, per lo sviluppo di sistemi diagnostici mentre nella seconda parte analizza in particolare l'applicazione delle biotecnologie alla diagnostica delle infezioni da retrovirus che, per la loro gravità e recente identificazione, forniscono un interessante modello delle potenzialità di tali approcci innovativi. Per facilitare inoltre l'approfondimento dei soggetti trattati, la bibliografia citata comprende essenzialmente reviews recenti ed il più possibile esaurienti. Il risultato di questo lavoro non poteva che essere eccellente considerato che per sviluppare questo tema ho invitato la Scuola del Prof. Albertini che, senza ombra di smentita è stato, con pionieristica lungimiranza, uno dei principali artefici dello sviluppo di questo settore in Italia ed in Europa ed ha contribuito con la Sua Scuola in modo significativo alla affermazione e diffusione di queste tecniche. Sono personalmente, e sono sicuro lo saranno anche i nostri lettori, molto soddisfatto che questo invito sia stato accettato e che ci sia stato affidato questo interessante contributo che rispecchia molto bene lo spirito didattico della collana.

Il gruppo di lavoro coordinato dal Prof. Albertini è giovane ma già affermato. La dott.ssa Maria Grazia Marin, laureata in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Parma, è specializzanda in Biochimica e Chimica Clinica e borsista dellaRegione Lombadia e dell'Istituto Superiore di Sanità.

La dott.ssa Cinzia Mazza ha conseguito la laurea in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Milano ed è attualmente specializzanda in Biochimica e Chimica Clinica. Nel 1994 ha ottenuto una borsa di studio dell'Istituto Superiore di Sanità finalizzata alla lotta all'A.I.D.S.

La dott.ssa Elisabetta Cariani ha conseguito la laurea in Medicina e Chirurgia presso l'Università di Modena, si è quindi trasferita a Parigi dove ha frequentato l'Università Pierre et Marie Curie conseguendo il Dottorato di Ricerca ed ottenendo la specializzazione in Microbiologia. E' quindi rientrata in Italia continuando la propria attività nel Consorzio per le Biotecnologie, Laboratorio di Biotecnologie a Brescia. Dal 1991 ricopre il ruolo di assistente presso il III Laboratorio Analisi dell'Ospedale di Brescia.

La dott.ssa Susanna Bresciani, laureata in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Milano, è specializzanda in Biochimica e Chimica Clinica presso l'Università degli Studi di Parma e diplomata al corso di formazione di ricercatori in Biotecnologie avanzate promosso dal MURST.

Il Professor Alberto Albertini, laureato in Medicina presso l'Università degli Studi di Parma, ha conseguito la libera docenza in Biochimica Applicata ed in Chimica Biologica. E' attualmente Professore Ordinario di Chimica Applicata alle Scienze Biomediche della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Brescia.

E' stato Associate Professor del Department of Immunology del New York Medical College; Delegato Italiano del Comitato Consultivo (CGC) per le Biotecnologie presso la Comunità Economica Europea a Bruxelles; Presidente del Comitato del Progetto Finalizzato Biotecnologie del Consiglio Nazionale delle Ricerche. E' anche Direttore della Scuola Universitaria di Tecnico di Laboratorio Biomedico dell'Università degli Studi di Brescia ed ha avuto tanti riconoscimenti che ne sottolineano il valore e lo spessore scientifico, sicuro viatico per i nostri lettori.

Sergio Rassu

1. Le biotecnologie nella diagnostica infettivologica

1.1. Premessa

La recente introduzione delle tecniche di biologia molecolare nel laboratorio clinico ha permesso lo sviluppo di metodologie completamente nuove in campo diagnostico. Le biotecnologie innovative hanno portato ad una migliore definizione del meccanismo di riconoscimento molecolare, ovvero della capacità delle macromolecole biologiche di interagire con strutture chimiche complementari. Questo ha permesso di sviluppare tecniche basate sull'utilizzo di reagenti innovativi come gli anticorpi monoclonali, gli antigeni ricombinanti o sintetici e le sonde di acidi nucleici (Tab. 1).

Al fine di sviluppare metodiche immunochimiche con elevate caratteristiche di sensibilità e specificità sono necessari reattivi di natura antigenica e anticorpale con il massimo grado di stabilità e purezza. Fino a qualche anno fa le fonti tradizionali per l'allestimento di questi metodi erano costituite da materiale biologico di origine umana, animale o microbica: l'avvento delle biotecnologie ha reso disponibili anticorpi ottenuti con la tecnologia degli ibridomi e antigeni prodotti per sintesi chimica o con la tecnica del DNA ricombinante (Tab. 2). Uno dei progressi più significativi è stato rappresentato dall'introduzione delle sonde genetiche, che hanno radicalmente modificato le modalità con cui, ad esempio, un agente infettante può essere identificato.

Le nuove tecnologie hanno consentito, quindi, una "rivoluzione" nel settore dell'immunodiagnostica, permettendo di sintetizzare prodotti dotati di elevata purezza e stabilità, a cui consegue una maggior specificità del riconoscimento molecolare. Inoltre le nuove tecnologie, permettono di evitare complessi e costosi procedimenti di purificazione e di ottenere prodotti dotati di caratteristiche assolutamente costanti nel tempo, dando la possibilità di produrre elevate quantità di reagenti a basso costo.

La diagnostica infettivologica rappresenta uno dei settori che più

Antigeni	Antigeni ricombinanti espressi in: - E. Coli - lievito - cellule di eucarioti superiori Antigeni sintetici
Sonde	Sonde molecolari (anticorpi monoclonali) Sonde genetiche

Tabella 1. Principali reagenti biotecnologici introdotti nella diagnostica infettivologica.

	Sorgente tradizionale	**Sorgente biotecnologica**
Antigene	Sieri o tessuti umani	DNA ricombinante Sintesi chimica di peptidi
Anticorpo	Siero umano immune Antisieri animali	Tecnologia degli ibridomi
Procedure di purificazione	Complesse	Semplici
Disponibilità	Limitata	Elevata
Caratteristiche	Instabilità Purezza variabile	Stabilità Uniformità Specificità

Tabella 2. Fonti di ottenimento e caratteristiche dei reattivi antigenici e anticorpali impiegati nei metodi immunologici.

ha risentito di questi sviluppi delle biotecnologie. La recente identificazione e la crescente diffusione dell'infezione da retrovirus umani, il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e lo "human T-lymphotropic virus" (HTLV), ha incrementato la domanda di sistemi sempre più sensibili e specifici per la sierodiagnosi di questi agenti infettivi.

1.2. Reagenti biotecnologici

1.2.1. Gli antigeni

L'antigene può essere definito come:

a) una molecola in grado di indurre una risposta immune indipendentemente dalla sua specificità (immunogenicità);

b) una molecola in grado di reagire immunospecificamente con un anticorpo, indipendentemente dalla capacità di indurne la formazione (specificità antigene).

Una alterazione chimica della molecola può provocare un incremento della risposta immune (maggiore immunogenicità) indipendentemente dagli effetti prodotti a livello della specificità antigene; viceversa, una variazione di specificità non sarà necessariamente collegata ad alterazioni del potere immunogeno.

Questo concetto di antigene ha suggerito inevitabilmente la possibilità di produrre un materiale antigenico ideale, in cui su di una singola macromolecola vengano riunite le parti minime indispensabili all'immunogenicità ed alla specificità antigene. In tal modo, verrebbero inoltre eliminate le porzioni della molecola originaria che potrebbero interferire, generando risposte immuni inutili o addirittura dannose.

I determinanti antigenici (o epitopi), che vengono riconosciuti specificamente dai siti di legame (o paratopi) delle molecole anticorpali, possono essere porzioni di una proteina, di acidi nucleici, di polisaccaridi, di lipidi o di altre molecole biologiche. Gli antigeni più studiati sono indubbiamente di natura proteica. Due vie sono state seguite per produrre antigeni "ideali": la tecnologia del DNA ricombinante e la sintesi chimica.

- Antigeni ricombinanti

La tecnologia del DNA ricombinante ha reso possibile l'isolamento, la modificazione e l'espressione di geni in cellule diverse da quelle di origine. In ambito diagnostico questa tecnologia ha consentito la produzione su larga scala di antigeni derivati da agenti patogeni, che possono sostituire gli agenti naturali in numerosi saggi (Gallina e Milanesi, 1992). Questi reagenti sono caratterizzati, rispetto agli

antigeni naturali, da sicurezza biologica, superiore omogeneità e maggiore economicità.

I vantaggi dell'uso di questa nuova tecnologia sono molteplici:

1) permette di evitare la manipolazione dell'agente infettivo nel corso del processo produttivo, riducendo il rischio per gli addetti alla produzione;

2) permette, mediante l'espressione in cellule eterologhe, la produzione di grandi quantità di un dato antigene, anche quando l'agente patogeno che lo possiede è di difficile o impossibile coltivazione;

3) può permettere, quando siano disponibili sieri immuni, l'individuazione (Van Regenmortel e Neurath,1990) e la caratterizzazione di agenti patogeni ancora sconosciuti (come è stato dimostrato, ad esempio, per i virus dell'epatite C ed E);

4) permette di "adattare" l'antigene ricombinante alle necessità del saggio diagnostico, per quanto riguarda ad esempio:

- le dimensioni dell'antigene
- la scelta o l'eliminazione di determinati epitopi
- l'aggiunta all'antigene di sequenze aminoacidiche in grado di migliorare la sensibilità, la precisione o la praticità del saggio.

Nel disegno del frammento da esprimere è necessario tener presente una serie di fattori, quali:

a) la specificità: se ad esempio una proteina antigenica virale contiene regioni di omologia con proteine di altri virus, che potrebbero essere fonte di false reattività, è necessario eliminare tali segmenti peptidici;

b) la sensibilità: è necessario che la conformazione del determinante antigenico sia il più possibile identica a quella riconosciuta da anticorpi umani specifici;

c) l'efficienza di espressione: uno degli aspetti critici, soprattutto per il trasferimento della tecnologia del DNA ricombinante su scala industriale, è costituito dall'efficienza di espressione, che si misura sia in termini di produttività del polipeptide ricombinante che di riproducibilità del processo.

E' necessario scegliere il sistema di espressione più adatto e, eventualmente, rimuovere i segmenti genici che non sono importanti ai fini dell'immunoreattività e che potrebbero essere causa dei problemi di espressione.

Nello scorso decennio, i sistemi di espressione per la produzione di proteine ricombinanti erano ristretti, per proteine con modificazioni post-traduzionali, alle cellule di roditore (generalmente CHO, cellule di ovaio di criceto cinese) o al lievito (*Saccharomyces cerevisiae*), mentre per le proteine di piccole dimensioni, semplici e non modificate a livello post-traduzionale, l'ospite di scelta era rappresentato da batteri (*Escherichia Coli*).

I progressi biotecnologici hanno progressivamente ampliato le possibilità di scelta tra i vari sistemi di espressione per proteine ricombinanti. La scelta del sistema ottimale può estendersi su organismi molto diversi: batteri, funghi, mammiferi, insetti e piante. I principali parametri che orientano nella scelta sono criteri di ordine biologico-molecolare e biologico-cellulare, oltre alla facilità di fermentazione e di purificazione.

Espressione in Escherichia Coli

Uno dei sistemi di espressione tuttora più utilizzati è rappresentato dall'*Escherichia Coli* (Fig. 1), che presenta una serie di vantaggi, quali:

- la possibilità di regolare l'espressione delle proteine eterologhe. Ad esempio, il promotore ibrido trp-lac è sottoposto al controllo negativo del repressore lac, prodotto costitutivamente da alcuni ceppi di E.Coli. L'isopropropiltio-β-Δ-galactoside (IPTG) è tuttavia in grado di legare il repressore e di indurre la trascrizione, permettendo l'espressione di geni esogeni posti sotto il controllo del promotore trp-lac;
- l'*E. Coli* cresce facilmente in terreni di semplice formulazione e non ha particolari necessità di ossigenazione; pertanto si possono raggiungere elevate densità cellulari (fino a 100 g in peso umido / L di coltura cellulare);
- l'ambiente di *E. Coli* è riducente; questo rappresenta un vantaggio per l'espressione di epitopi immunodominanti contenenti legami disolfuro, per la possibilità di promuovere la formazione di tali legami solamente dopo la purificazione, durante la procedura di *refolding* finale che precede l'immobilizzazione sulla fase solida.

I maggiori svantaggi degli antigeni ricombinanti espressi in *E.Coli* sono ascrivibili:

- alla necessità di ottenere un elevato grado di purificazione, oltre

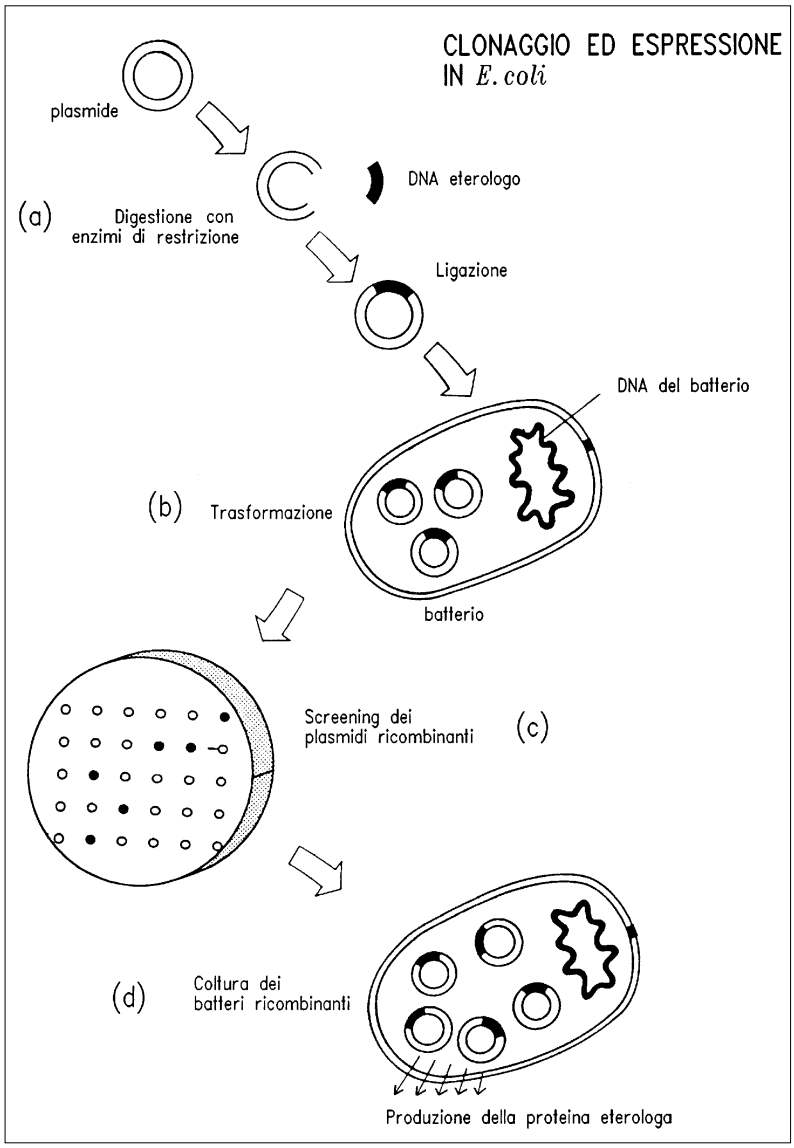


Figura 1. Espressione di geni in Escherichia Coli. (a) Il gene eterologo di interesse viene inserito in un plasmide; (b) il plasmide ricombinante viene introdotto nel batterio (trasformazione); i batteri ricombinanti vengono selezionati su piastra (screening) (c), e vengono coltivati in opportune condizioni producendo la proteina eterologa (d).

alla eliminazione della parte non antigenica del prodotto di sintesi (generalmente una proteina di fusione), che può dare origine a reazioni aspecifiche;

- alla possibile instabilità dell'elemento genetico ricombinante che codifica l'antigene;
- alla possibile tossicità del prodotto per il microrganismo produttore;
- alla possibilità che gli antigeni ricombinanti assumano una conformazione diversa rispetto agli antigeni naturali, comportando una alterata o diminuita reattività immunologica. Questa situazione può verificarsi frequentemente quando il polipeptide ricombinante viene prodotto in cellule batteriche. La proteina eterologa, infatti, si trova spesso aggregata in microcorpi di inclusione nel citoplasma della cellula produttrice e deve essere solubilizzata con agenti caotropici e successivamente rinaturata per poter essere utilizzata nel saggio. Il passaggio di rinaturazione è naturalmente critico perché il polipeptide possa riacquistare la sua corretta reattività immunologica e non sempre può essere eseguito in modo soddisfacente;
- alle modificazioni post-traduzionali. Come è noto, molti antigeni, dopo la sintesi primaria, vengono modificati nella cellula produttrice naturale mediante tagli proteolitici, glicosilazioni, fosforilazioni, miristilazioni ecc. I batteri non sono in grado generalmente di eseguire correttamente questi interventi, e ciò può determinare una alterazione della reattività immunologica del polipeptide. In alcuni casi è possibile ovviare a questo problema esprimendo il gene che codifica l'antigene in cellule di lievito o di mammifero (come è stato fatto, ad esempio, per l'antigene di superficie del virus dell'epatite B). In questo modo si ottengono antigeni correttamente modificati e generalmente indistinguibili dai corrispondenti antigeni naturali. I costi di produzione degli antigeni prodotti mediante espressione in cellule di mammifero sono, però, notevolmente più elevati di quelli prodotti in batterio o in lievito.

Espressione in lievito

Alcune proteine, per essere funzionali, debbono assumere una determinata configurazione tridimensionale, oppure andare incontro a modificazioni post-traduzionali, come glicosilazione,

fosforilazione, formazione di legami disolfuro etc., che possono essere effettuate in maniera non corretta o non avvenire del tutto nelle cellule batteriche. Per questi motivi, molte proteine da produrre su larga scala vengono espresse in eucarioti inferiori (lieviti), che costituiscono un sistema di produzione molto efficiente, relativamente facile da manipolare ed economico. L'espressione di proteine eterologhe in lievito si ottiene tramite il clonaggio del gene di interesse in plasmidi appropriati, preparazione di protoplasti (cellule di lievito prive di parete cellulare) e trasformazione di questi con il plasmide ricombinante. Il plasmide contiene anche un gene che codifica per la resistenza a particolari antibiotici, utilizzati per la selezione delle cellule ricombinanti.

Il *Saccharomyces cerevisiae* è considerato un valido sistema di espressione per la sua capacità di crescere ad alta densità cellulare e di processare e secernere proteine ricombinanti. Tuttavia, per quanto la sua genetica e la sua fisiologia siano ben conosciute, *S.cerevisiae* presenta alcune gravi limitazioni come ospite per l'espressione di proteine eterologhe:

- frequentemente è difficile ottenere alte rese di prodotto;
- la stabilità dei plasmidi durante il ciclo produttivo può essere bassa;
- le proteine possono essere iperglicosilate al punto che l'immunogenicità, l'attività e l'emivita sierica del prodotto ne risultano significativamente danneggiate;
- la produzione di grandi quantità di proteina eterologa può interferire con la crescita della coltura trasformata ed essere controproducente per la resa finale del procedimento. Questo problema può essere risolto con l'utilizzo di vettori di espressione contenenti promotori forti e inducibili, in quanto, grazie al passaggio dalla repressione all'induzione del promotore, si rende possibile la separazione del processo produttivo in una prima fase di crescita ed una seconda fase di espressione.

Recentemente sono stati proposti "lieviti alternativi", che permettono almeno in parte di superare questi problemi. I lieviti metilotrofici *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha* rappresentano sicuramente un vantaggio per quanto riguarda il problema dell'iperglicosilazione. La lunghezza media della catena di mannosi delle glicoproteine prodotte in *P. pastoris* è di 8-14 residui, contro più di 40 residui in *S. cerevisiae*. Il sistema *H. polymorpha*, inoltre, sembra essere l'ospite di elezione per la produzione di complessi formati da più subunità, permettendo l'assemblaggio delle subunità in rapporti stechiometrici corretti.

Espressione in cellule di eucarioti superiori

In alcune situazioni anche i lieviti, che in genere riconoscono in modo adeguato i segnali necessari per la sintesi, la corretta modificazione, la processazione e la secrezione di proteine codificate da geni di eucarioti superiori, si sono rivelati inadatti come sistemi di espressione. In questi casi una valida alternativa è rappresentata dall'uso di cellule di eucarioti superiori, in genere linee cellulari di origine tumorale che possono essere mantenute in coltura per lunghi periodi di tempo.

Per l'espressione di cellule di eucarioti superiori, come per gli altri sistemi sopra descritti, il segmento di DNA che codifica per la proteina di interesse viene inserito in un vettore che sia in grado di veicolarlo all'interno della cellula. La scelta del sistema di espressione (vettore e tipo cellulare) dipende dallo scopo per cui la proteina deve essere prodotta. Alcuni sistemi sono particolarmente adatti per l'espressione di una proteina in quantità più o meno elevata ma per un periodo limitato; altri sistemi sono stati messi a punto per ottenere un'espressione costante e riproducibile, quindi si prestano meglio alla produzione massiccia di proteine per fini industriali.

Il DNA eterologo viene spesso introdotto nelle cellule mediante trasfezione, in genere per mezzo di sostanze chimiche che permeabilizzano la membrana cellulare (calcio fosfato, DEAE destrano). L'efficienza di queste metodiche, tuttavia, non è altissima, anche se, per la loro semplicità, sono le più usate nei laboratori di ricerca. Un miglioramento di efficienza si può ottenere con l'uso di liposomi o lipopoliamine, che facilitano il legame con la membrana cellulare. Un altro metodo che aumenta notevolmente l'efficacia della trasfezione è l'elettroporazione: l'applicazione di un breve impulso elettrico ad alto voltaggio provoca l'apertura di micropori nella membrana plasmatica, attraverso cui può penetrare il DNA esogeno.

La struttura generale di un vettore plasmidico di espressione (Fig. 2) comprende elementi per la crescita in procarioti, quali l'origine di replicazione e la resistenza ad un antibiotico. Tali elementi sono essenziali per la crescita del plasmide in batteri, in modo da produrne elevate quantità necessarie per gli esperimenti di trasfezione. Il vettore deve, inoltre, contenere una serie di elementi funzionali eucariotici. Spesso si utilizzano vettori derivati da virus come SV40 o polioma, che possono raggiungere un numero di copie elevatissimo nelle cellule trasfettate, tanto che, generalmente, le cellule trasfettate muoiono dopo alcuni giorni, anche per il grande accumulo di prote-

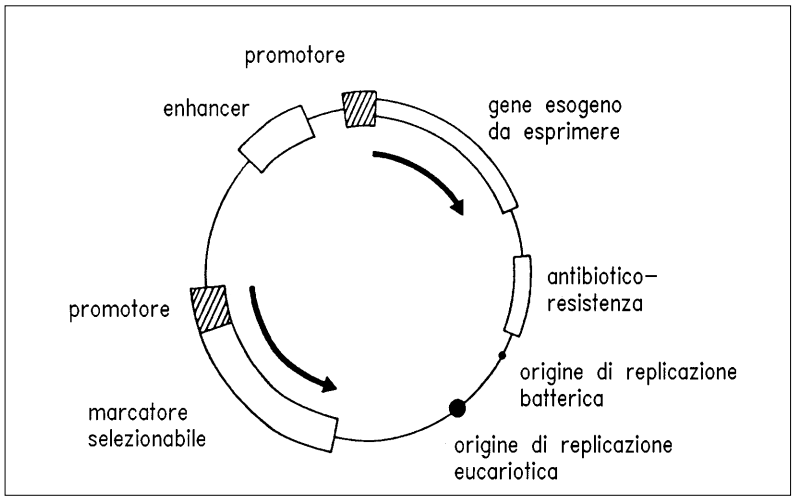


Figura 2. Struttura di un vettore di espressione per cellule di eucarioti superiori.

ina esogena prodotta. In alcuni casi può quindi essere conveniente l'uso di vettori con livelli di replicazione più bassi, come quelli derivati da virus del papilloma bovino (BPV) o dal virus di Epstein Barr (EBV).

In tutti questi vettori, il DNA esogeno deve essere posto sotto il controllo di un promotore e, in alcuni casi, di un *enhancer*, la cui scelta dipende dal tipo cellulare utilizzato e dall'efficienza con cui si desidera produrre la proteina. In alcuni casi vengono preferiti promotori inducibili, per poter modulare la sintesi di proteina. L'RNA trascritto a partire dal DNA esogeno deve avere una corretta terminazione (ottenuta inserendo un codon di stop a valle del gene esogeno) e deve essere poliadenilato, generalmente grazie ad un segnale appropriato contenuto nel vettore di espressione.

Dopo la trasfezione di cellule eucariotiche, solo una parte di queste incorpora il plasmide ricombinante e raramente lo integra stabilmente nel proprio genoma. Nella maggior parte dei casi, il DNA plasmidico resta in forma episomale e si assiste ad una selezione negativa delle cellule contenenti l'episoma. Pertanto, l'espressione del DNA esogeno ha una durata limitata (espressione transitoria).

Quando sia necessario generare una linea cellulare che esprima stabilmente la proteina di interesse (espressione stabile) vengono utilizzate metodiche che permettano la selezione positiva della frazione di cellule che ha integrato il plasmide ricombinante nel proprio genoma. A questo scopo viene trasfettata, insieme alla sequenza codificante per la proteina esogena, una sequenza che esprima un marcatore genetico selezionabile, tale da conferire la resistenza a determinate condizioni di coltura che non consentano la crescita delle cellule che ne sono prive. Il risultato finale di questo processo di selezione sarà l'ottenimento di una linea cellulare che esprime stabilmente il gene desiderato.

Il trasferimento di materiale genetico in cellule eucariotiche può anche essere effettuato mediante infezione delle cellule con un virus nel cui genoma è stato inserito il gene codificante per la proteina di interesse. Questo tipo di approccio ha diversi vantaggi:

- alcuni virus hanno un ampio spettro di infezione, permettendo l'introduzione di geni esogeni in diversi tipi cellulari;
- il processo di infezione è altamente efficiente rispetto alla trasfezione;
- la sintesi proteica della cellula ospite viene fortemente ridotta ed i prodotti virali, inclusa la proteina ricombinante, diventano maggioritari.

Alcuni sistemi di espressione basati su vettori virali hanno però alcune limitazioni:

- se la sequenza di DNA inserita è troppo lunga, il genoma virale tende a riarrangiarsi o a non essere regolarmente incapsidato;
- alcuni virus possono avere un effetto citopatico sulla cellula ospite, il che limita l'espressione ad un periodo ristretto.

Un sistema di espressione che sta diventando sempre più utilizzato per la produzione di proteine su larga scala è basato sull'infezione di cellule di insetto (*Spodoptera frugiperda*) per mezzo di baculovirus. Quest'ultimo è un virus litico a DNA che infetta gli artropodi e può essere facilmente propagato in cellule cresciute in sospensione. I vantaggi offerti da questo sistema consistono in:

- notevole rapidità di produzione ed alta resa in termini di proteina sintetizzata (1-500 mg per litro di coltura, fino a 100-200 volte maggiore di quella ottenibile in cellule di mammifero);
- processazione, modificazione e trasporto delle proteine in genere simili a quelli ottenuti in cellule di mammifero;
- notevole lunghezza dei frammenti che possono essere clonati nel genoma virale;

- incapacità del baculovirus di infettare i vertebrati e inattività dei suoi promotori in cellule di mammifero.

La processazione ottenibile in questo sistema non è però ottimale per tutti i tipi di proteine. Ad esempio, è stato descritto un inefficace clivaggio del precursore delle proteine dell'envelope HIV (gp160) nei prodotti finali gp120 e gp41.

L'efficacia del sistema è legata al particolare ciclo vitale del baculovirus. Dopo l'infezione, gran parte dei virioni prodotti si accumulano all'interno del nucleo (corpi di occlusione) fino alla lisi cellulare. Il genoma virale codifica per la poliedrina, una proteina che costituisce il guscio dei corpi di occlusione ma non è indispensabile per il ciclo vitale del virus. Il gene codificante per la proteina che si vuole esprimere viene clonato in un vettore appropriato, in cui è fiancheggiato da sequenze del gene della poliedrina. La cotrasfezione del vettore ricombinante insieme a DNA di baculovirus porta ad una ricombinazione omologa tra il gene virale della poliedrina e il DNA del vettore. In pratica, il gene esogeno rimpiazza il gene della poliedrina nel genoma virale, inserendosi nella stessa posizione in cui era stato clonato nel vettore. Anche se la ricombinazione omologa avviene in una scarsa percentuale di casi (1-5%), le placche di lisi contenenti i virus ricombinanti sono individuabili sia al microscopio (mancanza di corpi di occlusione) sia per mezzo di ibridazione con sonde corrispondenti alla sequenza del gene esogeno. I virus ricombinanti sono, quindi, purificati ed utilizzati per l'espressione tramite infezione di colture cellulari (Fig. 3).

- Antigeni sintetici

Sono state sviluppate tecnologie sempre più sofisticate e, nello stesso tempo, di facile applicazione per la sintesi chimica di antigeni e per l'uso di questi nei sistemi diagnostici (Ripalti, 1992).

I vantaggi della produzione di peptidi sintetici sono principalmente:

- la possibilità di utilizzare sistemi automatizzati
- l'alta resa di produzione
- i tempi relativamente brevi
- l'ottenimento di un prodotto libero da proteine contaminanti e facilmente purificabile, per la successiva immobilizzazione su micropiastra (sistemi di tipo ELISA).

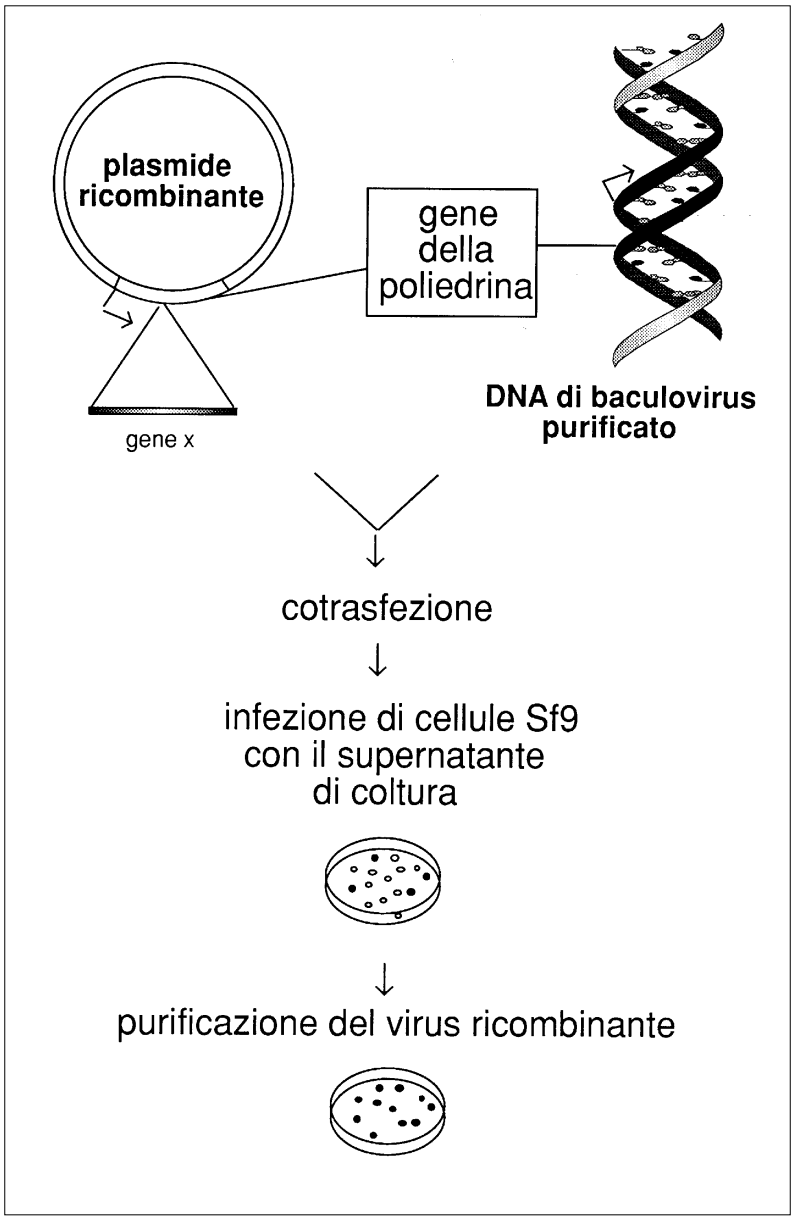


Figura 3. Rappresentazione schematica dell'espressione di proteine in cellule di insetto.

Esistono, però, alcuni svantaggi legati alla produzione ed all'uso dei peptidi per lo sviluppo di test diagnostici:

- la necessità di conoscere le sequenze proteiche (ad esempio, virali) e le variazioni antigeniche;
- ogni peptide rappresenta un solo epitopo; ai fini diagnostici è necessario, quindi, l'uso di una serie di peptidi per ovviare a problemi di variabilità antigenica;
- la difficoltà ed il costo elevato per la sintesi di peptidi di notevole lunghezza.

Criteri per la scelta di peptidi

Ai fini della progettazione di peptidi utili nei sistemi diagnostici, sono stati sviluppati metodi per definire i siti dominanti riconosciuti dal sistema immunitario e accessibili al legame anticorpale.

I siti antigenici sono stati originariamente descritti come sequenziali (dipendenti solo dalla sequenza aminoacidica e non dalla conformazione) o conformazionali. Più recentemente, tuttavia, tutti i siti antigenici sono stati considerati conformazionali, ma classificati come continui sulla catena aminoacidica o discontinui, in cui i residui che costituiscono l'epitopo possono non essere contigui nella sequenza primaria, ma sono ravvicinati dal *folding* nella struttura tridimensionale della proteina.

La maggior parte, se non l'intera superficie di una proteina è attualmente considerata come potenzialmente antigenica. Pertanto, il primo approccio per la predizione di potenziali antigeni consiste nell'identificazione di peptidi che, in base alle loro caratteristiche di idrofilicità, si potrebbero trovare sulla superficie della proteina. E' stata anche descritta una correlazione tra la mobilità di una regione potenzialmente antigenica e la possibilità di essere esposta sulla membrana, in quanto le regioni "nascoste" di una proteina tendono ad essere meno flessibili di quelle esterne. Altri autori hanno proposto che non tanto la mobilità, quanto l'accessibilità delle sequenze aminoacidiche determini la loro antigenicità. E' possibile anche calcolare un "indice di protrusione" per localizzare i determinanti antigenici continui che si trovano esposti sulla superficie di proteine a struttura nota.

E' necessario distinguere la predizione di epitopi coinvolti nell'immunità umorale (produzione di anticorpi) dall'identificazione di peptidi riconosciuti dalla risposta *helper* T cellulare. In quest'ultimo caso, frammenti peptidici di proteine esogene sono presentati alla superficie cellulare nel contesto del complesso maggiore di

istocompatibilità (MHC) di classe II. Il complesso peptide-MHC viene riconosciuto dalle cellule T helper che stimolano la produzione di anticorpi verso quell'antigene da parte di cellule B specifiche. Studi approfonditi hanno portato alla conclusione che le regioni contenenti eliche anfipatiche (alternanza di segmenti idrofobici e idrofilici) sono particolarmente antigeniche per le cellule T *helper*. Sono stati quindi sviluppati algoritmi per la predizione di questo tipo di antigenicità, che potrebbero essere utili in futuro per la sintesi di vaccini peptidici che incorporino epitopi sia T che B cellulari.

I siti antigenici di una proteina possono essere predetti sia dalla struttura tridimensionale che dalla sequenza aminoacidica primaria. L'utilizzo della struttura tridimensionale è più affidabile, in quanto essa include i fattori predominanti per l'antigenicità, la mobilità e la topografia di superficie. Sfortunatamente, le strutture tridimensionali complete sono raramente note e gli algoritmi predittivi, basati sui molto più numerosi dati di sequenza primaria, sono meno affidabili.

Gli algoritmi proposti per la predizione di siti antigenici a partire dalla struttura primaria di una proteina si basano sull'osservazione che gli epitopi si trovano in regioni superficiali, molto esposte all'azione di solventi, e che aminoacidi carichi e idrofilici sono una caratteristica comune dei siti antigenici. Il maggiore svantaggio nell'utilizzo dell'indice di idrofilicità per predire l'antigenicità è che non tutti i siti antigenici sono idrofilici, e che solitamente solo i picchi maggiori di idrofilicità possono essere presi in considerazione per prevedere con buona approssimazione la presenza di epitopi.

Un secondo approccio per la predizione di antigenicità considera l'accessibilità di superficie come fattore determinante. Identificare le regioni delle proteine più esposte è semplice qualora si conosca la struttura tridimensionale della proteina. Si è tentato di prevedere l'accessibilità direttamente dalla struttura primaria o, indirettamente, da algoritmi utilizzati per dedurre la struttura secondaria partendo dalla struttura primaria, in base all'osservazione che i ripiegamenti della proteina (*loops* e *turns*) tendono ad essere più frequenti nelle regioni superficiali. Queste strutture secondarie hanno anche la tendenza ad essere più mobili, caratteristica che può fornire ulteriori informazioni sulla potenziale antigenicità di una porzione della proteina. Algoritmi che tengono conto di varie combinazioni di queste caratteristiche strutturali sono stati proposti per la predizione dell'antigenicità (Stern, 1991; tab. 3).

Metodo	Vantaggi	Svantaggi
Profilo di idrofilicità / idropaticità	Basato sulla sequenza	Scarsa correlazione
Topografia strutturale	Buona correlazione	Richiede la struttura tridimensionale
Struttura secondaria	Basato sulla sequenza	Scarsa correlazione
Mobilità	Buona correlazione	Richiede la struttura tridimensionale
Flessibilità	Basato sulla sequenza	Scarsa correlazione
Protocolli combinati	Predizione più affidabile dei singoli parametri	
Anfipaticità	Utile per gli antigeni T cellulari	Predizione in eccesso

Tabella 3. Metodi per la predizione dell'antigenicità.

Schematicamente, conoscendo la sequenza del gene che codifica per una proteina, si possono seguire diverse strategie per l'identificazione dei siti antigenici:

- analizzare la sequenza aminoacidica mediante algoritmi sviluppati sulla base di dati sia teorici che empirici, come descritto sopra. Gran parte degli algoritmi predittivi sono disponibili come programmi di computer in varie forme;
- utilizzare una serie di peptidi la cui sequenza, parzialmente sovrapposta, copra tutta la proteina (*peptide walking*). Questi peptidi possono essere sintetizzati su microsupporti di polistirene attivato chimicamente e, dopo la deprotezione dei gruppi laterali, essere testati con sieri di individui contenenti anticorpi specifici.

Nella scelta di un peptide sintetico con buone caratteristiche di determinante antigene è anche necessario tenere presente che tale peptide:

- non deve contenere siti di N-glicosilazione, a causa della profonda alterazione antigenica provocata da residui di carboidrati;
- non deve contenere siti di fosforilazione, che alterano profondamente lo scheletro dell'antigene.

Una volta identificata una sequenza che risponde ai requisiti descritti, si procede alla sintesi su larga scala di peptidi derivati da tale sequenza e, quindi, al loro saggio mediante antisieri specifici per la proteina nativa. Per confermare la specificità della reazione è

ovviamente necessario anche saggiare la capacità dei peptidi di sintesi di inibire la reazione tra la proteina e gli anticorpi ad essa specifici.

Per esempio, nella proteina transmembrana gp41 di HIV-1, soltanto la regione ricca di β-eliche, precedente i siti di glicosilazione e posta tra l'estremità N-terminale e l'esteso sito idrofobico considerato di transmembrana, è stata individuata come posta superficialmente alla membrana senza ulteriore modificazione. La sequenza di questa zona, riconosciuta generalmente da sieri umani positivi per anticorpi anti-HIV, è piuttosto conservata, e pertanto tale peptide è entrato a far parte degli antigeni utilizzati per la diagnostica dell'infezione da HIV.

La possibilità di utilizzare un peptide come antigene può tuttavia essere definita solo sperimentalmente. Un peptide può, infatti, comportarsi in modo inaspettato: non reagire (per esempio quando mancano sequenze adiacenti che conferiscono stabilità ad una conformazione dell'epitopo) o reagire in modo aspecifico (se, per esempio, pur in assenza di omologia di sequenza, il peptide riproduce siti antigenici di altre proteine riconosciute dall'ospite).

- Librerie peptidiche

Un approccio alternativo per l'identificazione di peptidi riconosciuti dalla risposta immunitaria, e quindi rilevanti dal punto di vista diagnostico o per l'utilizzo come vaccini, consiste nella sintesi di librerie peptidiche di origine chimica o ricombinante. Lo s*creening* di tali librerie permette di selezionare peptidi capaci di interagire con le molecole bersaglio (anticorpi, recettori etc.). Tuttavia, la localizzazione del sito di interazione sulla proteina nativa non è definibile a priori e richiede ulteriori studi di mappatura.

Librerie di peptidi sintetici

Diversi approcci sono stati proposti per la sintesi chimica di librerie peptidiche. Uno dei procedimenti di sintesi più utilizzati si basa sull'accoppiamento di un singolo residuo aminoacidico ad una resina formata mescolando in parti uguali resine derivatizzate con 19 diversi aminoacidi (la cisteina viene solitamente esclusa per evitare problemi di reattività legate ai gruppi sulfidrilici). Dopo l'accoppia-

mento del primo aminoacido, la resina viene suddivisa in varie aliquote ed ogni aliquota posta in accoppiamento con un diverso aminoacido. Le varie resine vengono poi raggruppate, mescolate, risuddivise e sottoposte ad ulteriori accoppiamenti con altri aminoacidi. Il processo viene ripetuto più volte fino all'ottenimento di peptidi della lunghezza desiderata. Alla fine del procedimento, ogni singola particella di resina è caratterizzata dalla presenza di peptidi della stessa sequenza. La soluzione peptide-resina viene sospesa in una soluzione contenente la molecola bersaglio, derivatizzata con un enzima o con derivati colorati o fluorescenti. Dopo centrifugazione e ripetuti lavaggi della resina, solo poche particelle di resina risulteranno colorate. Le particelle colorate, dopo eliminazione della molecola bersaglio, possono essere sottoposte a microsequenza del peptide adeso, che viene poi sintetizzato in quantità sufficienti per l'analisi delle sue caratteristiche antigeniche. Questa tecnica (*Selectide Process*) presenta enormi vantaggi in termini di facilità operativa e rapidità di analisi. La stessa libreria peptidica può inoltre essere utilizzata più volte (Lam e al., 1991).

Alternativamente, librerie peptidiche possono essere prodotte mediante sintesi in fase solida, incorporando in tutte le posizioni una miscela costituita da tutti gli aminoacidi in proporzioni equimolari (Houghten e al., 1991). La natura del primo aminoacido di ogni sintesi è nota, in modo da poter identificare il primo residuo necessario per una determinata attività biologica. In questo modo, per sintesi e screening successivi, è possibile arrivare all'identificazione di ogni singolo residuo della sequenza peptidica attiva.

Librerie di peptidi ricombinanti

E' possibile ottenere librerie peptidiche espresse da batteriofagi filamentosi ricombinanti. In tali librerie, ogni fago può sintetizzare una sola sequenza peptidica casuale (*random*) come prodotto di fusione con la proteina pIII, che è presente, nel rivestimento, in 5 copie per fago. In questo modo è possibile ottenere fino a 40 milioni di differenti esapeptidi in una singola libreria (Scott e Smith, 1990). La sequenza codificante per i peptidi *random*, rappresentata da oligonucleotidi di sintesi contenenti sequenze casuali (oligonucleotidi degenerati), viene inserita in un fagemide (frammento di DNA contenente l'origine di replicazione del fago, ma dipendente da un

fago *helper* per l'incapsidazione) a monte del gene codificante per la proteina pIII. I fagemidi vengono utilizzati per la trasformazione di *E. Coli* e la coltura batterica viene infettata con il fago *helper*, portando alla produzione di fagi ricombinanti.

I fagi che esprimono il peptide di interesse vengono poi selezionati mediante purificazione per affinità e vengono amplificati infettando *E. Coli*. Dopo ripetuti passaggi di purificazione ed amplificazione, i fagi selezionati vengono clonati per determinare la sequenza nucleotidica che codifica per il peptide di interesse.

Il vantaggio di questa metodica consiste nella possibilità di ottenere sequenze peptidiche più numerose e di maggiore lunghezza nella fase iniziale. Non è possibile, tuttavia, introdurre alcuna modificazione non naturale dei peptidi. Inoltre, la costruzione e l'analisi delle librerie è lunga e laboriosa rispetto a quella delle librerie di peptidi sintetici.

1.2.2. Le sonde

- Le sonde molecolari (anticorpi monoclonali)

Negli ultimi anni si sono resi disponibili anticorpi ottenuti con la tecnologia degli ibridomi. Questa tecnica consiste nella immunizzazione di un topo con l'antigene d'interesse e nella successiva fusione (mediante glicole polietilenico o indotta elettricamente) dei linfociti B splenici con cellule di una linea di mieloma murino.

L'immunizzazione determina la comparsa nella milza del topo di cloni di linfociti B, che producono anticorpi in grado di legare l'antigene. La loro fusione con le cellule di mieloma determina la formazione di cellule ibride con entrambe le caratteristiche parentali: la capacità di crescere indefinitamente in vitro e la specificità immunoglobulinica (Fig. 4).

Da quando, nel 1975, fu descritta da Kohler e Milstein la tecnologia di ibridazione somatica applicata alla produzione di anticorpi monoclonali murini, sono stati prodotti, con un approccio ormai standardizzato, moltissimi reagenti diretti contro i più svariati antigeni, che hanno praticamente ridefinito tutto il settore degli immunodiagnostici.

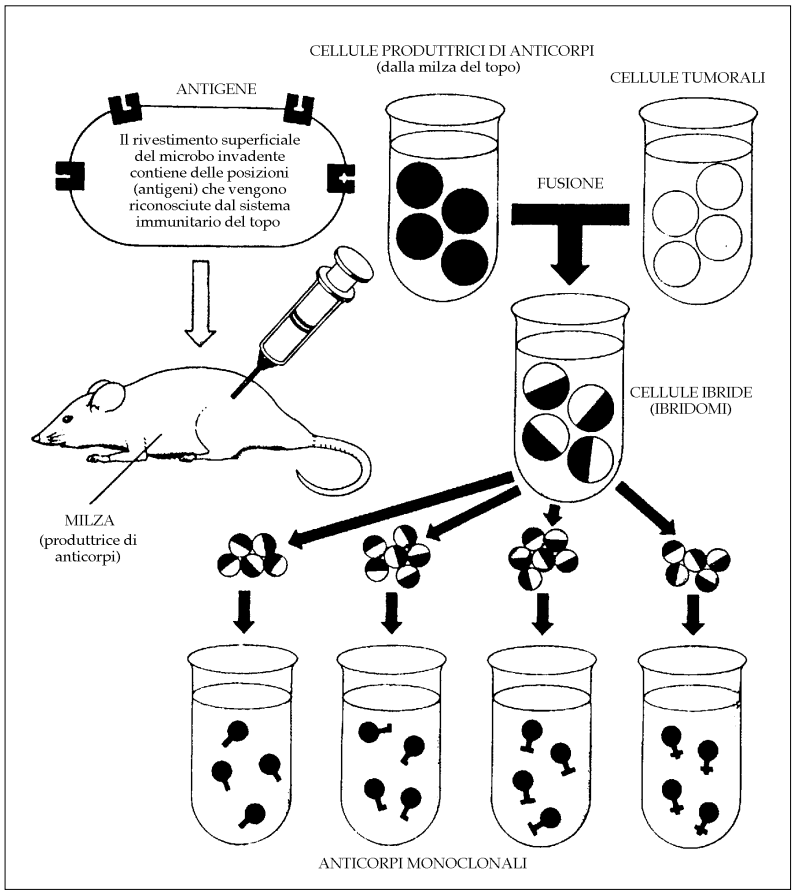


Figura 4. Tecnica per la produzione di anticorpi monoclonali. Le cellule B della milza del topo, dopo immunizzazione, vengono fuse con cellule di mieloma. Le cellule ibride risultanti vengono esaminate per identificare quelle che hanno ereditato i geni anticorpali delle cellule B normali e che secernono gli anticorpi monoclonali che possono legarsi all'antigene immunizzante.

Sono state, inoltre, sviluppate tecniche per la produzione di anticorpi "chimerici", costituiti da regioni variabili murine specifiche per l'antigene legate a regioni costanti umane (Meulemans e al., 1993). In breve, i geni che codificano per l'anticorpo monoclonale prodotto da un ibridoma di topo, vengono manipolati in vitro in

modo da mantenere solo le sequenze variabili, che vengono aggiunte ad una sequenza di regioni costanti di geni di immunoglobuline umane. Il prodotto viene reintrodotto in cellule linfoidi (generalmente murine), impiegando un opportuno vettore che consente l'espressione e la funzionalità del prodotto.

Recenti studi hanno messo in luce le potenzialità degli anticorpi monoclonali umani quali sonde per lo studio della struttura di antigeni, ad esempio virali, e per lo sviluppo di vaccini a partire da peptidi naturali, sintetici o ricombinanti. Inoltre è stata dimostrata la possibilità di produrre anticorpi dotati di attività neutralizzante nei confronti del microrganismo infettivo (Grossi e al., 1993). Gli anticorpi monoclonali umani si candidano, quindi, come validi strumenti per un nuovo approccio allo studio della risposta immune verso agenti patogeni, come l'HIV.

Nonostante i metodi immunologici abbiano notevolmente migliorato la diagnostica delle malattie infettive sia a livello di sensibilità che di specificità e gli anticorpi monoclonali, in particolare, abbiano grandi potenzialità in campo clinico, esiste una serie di limiti inerenti al loro impiego nell'identificazione di agenti patogeni.

In particolare si sottolinea :

- la mancata espressione, da parte di singoli ceppi virali o batterici, di antigeni specifici rivelabili, o l'assenza di determinanti antigenici comuni tra ceppi diversi, con conseguente difficoltà nell'allestimento di metodi in grado di riconoscere tutte le varianti;
- il legame tra la sensibilità del metodo e la concentrazione dell'antigene nel campione biologico, l'affinità dell'anticorpo e l'eventuale presenza di immunocomplessi;
- le variazioni antigeniche, che potrebbero impedire il riconoscimento dell'antigene stesso.

- Le sonde genetiche

Uno dei progressi più significativi in campo diagnostico è stato rappresentato dall'utilizzo di sonde genetiche, che hanno radicalmente modificato le modalità con cui gli agenti infettanti possono essere evidenziati ed identificati.

Le tecniche di ibridazione degli acidi nucleici permettono la determinazione diretta della presenza del genoma virale o batterico, indipendentemente dall'espressione di antigeni evidenziabili mediante una reazione immunologica (Tab. 4).

	SONDA GENETICA	ANTICORPO
Bersaglio	genoma	antigene
Informazioni	genotipo	fenotipo
Sensibilità	Ka= 10^{15}	Ka= 10^{9} - 10^{12}
Specificità	elevata	variabile

Tabella 4. Caratteristiche dei test diagnostici basati sull'utilizzo delle sonde di acidi nucleici e sugli anticorpi monoclonali.

In base alla sola conoscenza del gene di interesse è possibile ottenere precise sequenze di acido nucleico, da usare come sonde per identificare sequenze complementari nel DNA o RNA estratti da preparati cellulari o campioni biologici.

Come per i dosaggi immunologici, la sensibilità e la specificità sono parametri cruciali ai fini della validità metodologica e diagnostica di questo tipo di indagini. La sensibilità delle reazioni di ibridazione è estremamente elevata: la costante di associazione delle sonde è di circa 10^{15} / mole (rispetto ai valori compresi tra 10^{9} e 10^{12} per la reazione antigene-anticorpo). Anche la specificità è estremamente elevata in quanto la necessaria complementarietà tra la sequenza di basi della sonda e quella dell'acido nucleico bersaglio opera una netta selezione nei confronti di ibridazioni aspecifiche.

Lo sviluppo dei metodi analitici basati sull'ibridazione degli acidi nucleici prevede una serie di passaggi metodologici che schematicamente comprendono (Tab. 5):

a) la produzione della sonda: condizione essenziale è l'isolamento di una particolare sequenza di DNA o RNA dal genoma di un determinato microrganismo. Con la tecnologia del DNA ricombinante è possibile clonare la sequenza di interesse da utilizzare come sonda (Swaminathan e Prakash, 1989). E' anche possibile sintetizzare chimicamente frammenti oligonucleotidici, riducendo notevolmente il tempo di preparazione della sonda, purché si conosca la sequenza di basi che si vuole riprodurre (Maniatis e al., 1989; Thein e Wallace, 1986);

(1) PRODUZIONE DELLA SONDA		
	BIOLOGICA	CHIMICA
	genomica	oligonucleotide
	cDNA	(a DNA o RNA)
	RNA	
(2) MARCATURA DELLA SONDA		
	ISOTOPICA	NON ISOTOPICA
	^{32}P	biotina
	^{35}S	digossigenina
	^{125}I	fluorescina
		enzimi
(3) IBRIDIZZAZIONE		
	FASE LIQUIDA	FASE SOLIDA
		- su tessuto (in situ)
		- su filtro (Dot Blot, Southern / Northern Blot)
		- su micropiastra
(4) SVILUPPO DEL SEGNALE		
	- autoradiografia	
	- fluorimetria	
	- chemioluminescenza	
	- reazione enzimatica-colorimetrica	

Tabella 5. Principali passaggi metodologici per lo sviluppo di metodi analitici basati sull'ibridazione degli acidi nucleici.

b) la marcatura della sonda: le sonde da utilizzare per l'ibridazione molecolare devono essere opportunamente modificate per rivelarne la presenza dopo la formazione dell'ibrido. Sono stati sviluppati sistemi di marcatura diversi da quella con isotopi radioattivi (Tchen e al., 1984; Jablonsky e al., 1984), per evitare l'utilizzo di questi reattivi, potenzialmente pericolosi e a decadimento rapido, nel laboratorio clinico. Nella sequenza nucleotidica possono essere introdotti marcatori (come biotina, digossigenina, fluorescina, enzimi) per via chimica o enzimatica (Renz e Kurz, 1983);

c) l'ibridazione: le tecniche sono riconducibili a due tipi base: 1. ibridazione in fase liquida, che costituisce indubbiamente il sistema più semplice e rapido, ma richiede lo sviluppo di un efficiente sistema di separazione dell'ibrido dalla sonda libera (Vogelstein e

Gillespie, 1977), e 2. ibridazione su supporto solido (filtri, micropiastre,etc.). Le tecniche di blotting sono basate sull'utilizzo di filtri di nitrocellulosa o nylon sui quali viene fissato l'acido nucleico bersaglio per la formazione dell'ibrido (Thomas, 1980).

L'ibridazione in situ presenta analogie metodologiche con le comuni tecniche immunoistochimiche già consolidate nel laboratorio di microbiologia ed anatomia patologica (Brigati e al. 1983);

d) la rivelazione del segnale, che testimonia l'avvenuta ibridazione, è chiaramente in funzione del tipo di sonda utilizzata. E' opportuno sottolineare che, con sistemi basati sull'utilizzo di sonde fredde, la perdita di sensibilità è di un fattore compreso fra 20 e 50 rispetto alle tecniche con sonde radioattive.

1.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

La sensibilità delle tecniche basate sull'impiego delle sonde molecolari è direttamente proporzionale al numero di copie del DNA bersaglio che deve essere identificato. E' chiaro che, se la quantità di DNA bersaglio è elevata, il problema non esiste; se però la quantità di acido nucleico nel campione è scarsa, la quantità di ibridi formatisi può essere talmente limitata da non essere rivelabile, qualunque sia la quantità di sonda e la fonte di segnale ad essa associata.

Questo problema è stato superato con l'introduzione della "Polymerase Chain Reaction" (o reazione polimerasica a catena, PCR), che permette di amplificare in modo esponenziale la sequenza bersaglio presente nel campione biologico (Mullis e Faloona, 1987; Saiki e al., 1988). Anche considerando che l'efficienza della reazione, ad ogni ciclo, non è del 100%, la stima media di amplificazione, in una tipica PCR costituita da 30 cicli, è di 10^{10} volte il target iniziale.

Mediante PCR è, quindi, possibile l'identificazione di poche copie di genoma (virtualmente anche una singola copia) presenti nel campione biologico, e quindi un livello di sensibilità impensabile fino a pochi anni fa e notevolmente superiore rispetto sia ai metodi immunologici che ai metodi di ibridazione tradizionali.

Una sequenza nota di DNA, dopo denaturazione, viene ibridata a corte sequenze di DNA sintetiche (*primers* oligonucleotidici), che dirigono la sintesi di una catena complementare di DNA per mezzo di una DNA polimerasi termostabile (Fig. 5). Ad opportune condizioni di temperatura, le sequenze complementari si disappaiano

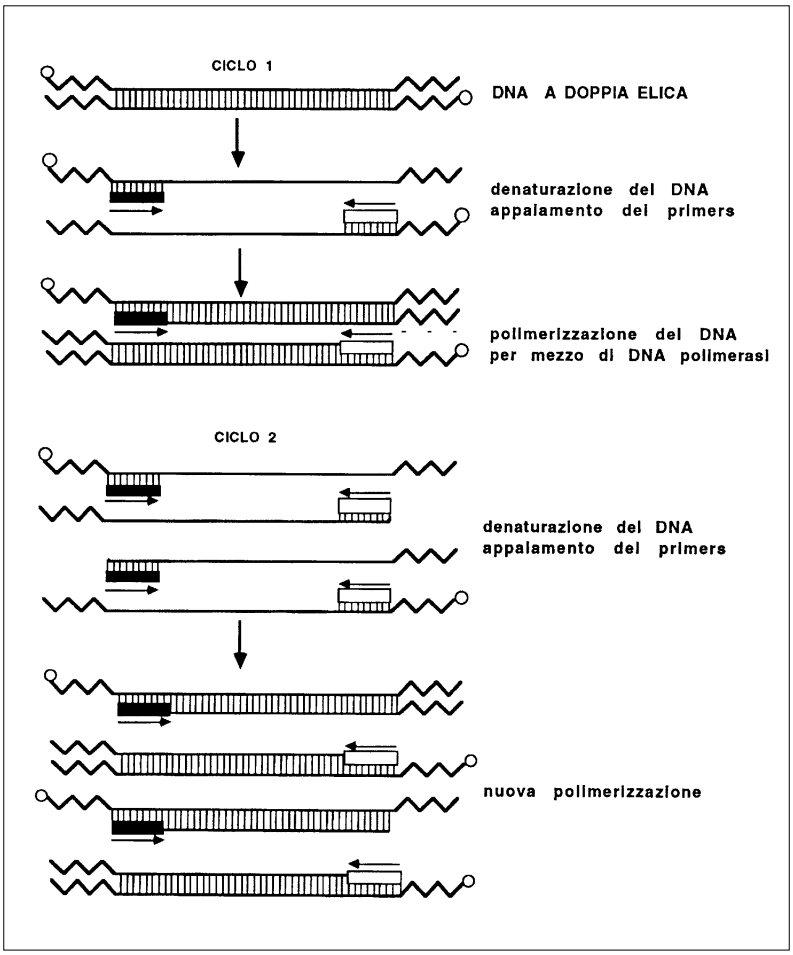


Figura 5. Principio della reazione polimerasica a catena (PCR).

(denaturazione) e sono nuovamente disponibili per l'ibridazione. La ripetizione di diversi cicli successivi di ibridazione-sintesi di DNA-denaturazione dà origine ad una amplificazione esponenziale delle sequenze di DNA inizialmente presenti nel campione. Quando le sequenze bersaglio sono costituite da RNA, come nel caso del virus HIV, si renderà necessaria una tappa preliminare di trascrizione inversa, ossia di sintesi di una catena di DNA complementare.

Sono stati sviluppati vari metodi di rivelazione del prodotto amplificato, basati sull'ibridizzazione con oligonucleotidi specifici marcati (ad esempio con traccianti fluorescenti, chemioluminescenti o con biotina o digossigenina) e sistemi a micropiastra, dot-blot o elettroforesi capillare (Keller e al., 1989; Cheab e Kan, 1989; Kemp e al., 1989).

I sistemi più utilizzati in ambito diagnostico sono molto simili, nel principio e nel formato, ai comuni test immunoenzimatici e, quindi, sono adatti ad essere automatizzati, consentono di analizzare contemporaneamente un numero elevato di campioni, necessitano di strumentazioni già disponibili in un laboratorio diagnostico (come lavatori automatici e lettori di micropiastre) e forniscono i risultati in tempi brevi (Mantero e al., 1991; Butcher e Spadoro, 1992).

L'applicazione della PCR a fini diagnostici richiede, tuttavia, un corretto ed attento impiego da parte del laboratorista. L'estrema sensibilità della PCR rappresenta infatti, paradossalmente, uno dei problemi tecnici più seri: la presenza anche di una singola copia o di poche copie di DNA bersaglio in un campione negativo, dovuta a cross-contaminazione fra i campioni o a *carryover* (trascinamento) di DNA precedentemente amplificato, può portare a risultati falsamente positivi. Sono stati sviluppati diversi approcci per eliminare selettivamente il materiale contaminante dalla miscela di reazione. Un sistema molto efficace è quello basato sull'utilizzo di dUTP al posto di dTTP nella miscela di reazione e il trattamento dei campioni, prima dell'amplificazione, con l'enzima uracil-N glicosilasi (UNG). Questo enzima è in grado di riconoscere ed eliminare selettivamente il DNA derivante da precedenti amplificazioni, lasciando inalterato il DNA nativo presente nel campione da testare (Longo e al., 1993). E' necessario, inoltre, organizzare il laboratorio in aree ben precise, ciascuna corrispondente ad una fase della procedura, seguire una serie di precauzioni ed inserire dei controlli, negativi e positivi, opportunatamente selezionati. Grazie ai nuovi metodi sviluppati, se si opera in condizioni attentamente controllate, il problema delle contaminazioni (falsi positivi) è notevolmente ridotto.

L'impiego della PCR nei laboratori diagnostici e la sua applicazione come test di screening o di conferma richiede, comunque, un intenso lavoro di standardizzazione e severi controlli di qualità, con l'attuazione di programmi multicentrici.

2. Diagnosi dell'infezione da HIV

2.1. Premessa

Una delle prime e più importanti applicazioni delle tecniche biotecnologiche è stata la diagnosi dell'infezione da retrovirus umani. Questa classe di virus, già noti da tempo come agenti eziologici di tumori animali, non era mai stata identificata come patogena per l'uomo e, date le difficoltà di coltivazione in vitro, non era stata particolarmente studiata fino agli anni '70. Il primo retrovirus umano, l'HTLV-I, che può indurre una leucemia / linfoma delle cellule T, è stato isolato nel 1980. Successivamente sono stati identificati il virus HTLV-II e i virus HIV-1 (nel 1984) e HIV-2 (Tab. 6).

I retrovirus possiedono un genoma costituito da RNA e sono dotati di una DNA polimerasi-RNA dipendente che consente la trasformazione dell'RNA virale in DNA integrabile nel genoma della cellula ospite (Weber e al., 1992). Al microscopio elettronico l'HIV si presenta (Fig. 6) come una particella sferica del diametro di

SOTTOCLASSE	OSPITE NATURALE	RETROVIRUS UMANI
Spumavirus	uomo altri mammiferi	Virus schiumoso
Oncovirus	uomo altri mammiferi uccelli rettili	HTLV-I HTLV-II
Lentivirus	uomo altri primati ovini equini	HIV-1 HIV-2

Tabella 6. Classificazione dei retrovirus.

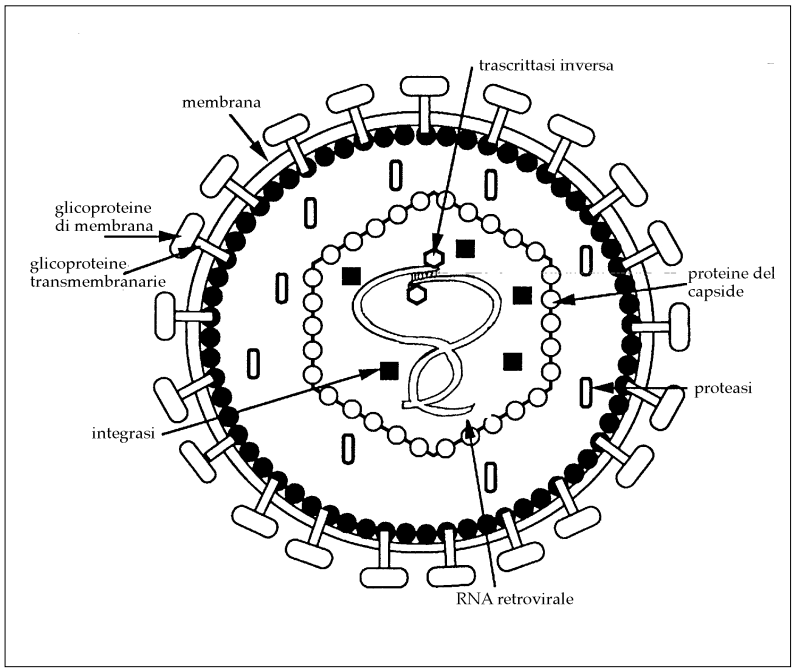


Figura 6. Struttura di un retrovirus.

100-120 nm costituita da un involucro fosfolipidico (envelope), derivato dalla membrana citoplasmatica della cellula ospite, nel quale vengono inserite le glicoproteine di superficie del virus (gp120, orientata verso l'esterno, e gp41, orientata verso l'interno, derivate da un unico precursore, gp160). Il core dell'HIV contiene 4 proteine del nucleocapside: il polipeptide p24 (che forma la parte interna), la proteina miristilata p17 (associata alla superficie interna del doppio strato lipidico), la proteina p7 (legata direttamente all'RNA genomico) e la p9 (Greene, 1991).

Come la maggior parte dei retrovirus, l'HIV contiene i geni gag (contenente l'informazione genica per il core proteico del virione), pol (codificante per la transcrittasi inversa) e env. Quest'ultimo gene è responsabile della sintesi delle glicoproteine virali che riconoscono il recettore CD4 sulla superficie delle cellule bersaglio, dando inizio al processo infettivo (Tab. 7). In aggiunta a questi geni principali, l'HIV presenta altre sequenze (Fig. 7) dotate di funzione regolatoria

gene	funzione proteine
gag (group-antigen gene)	p55 (p7, p9, p18, p24) proteine specifiche del core
pol (polymerase)	p55/61, p31 transcrittasi inversa e integrasi
env (envelope)	gp160 (gp41+gp120) glicoproteine specifiche dell'involucro esterno
vif (virion infectivity factor)	p23 fattore che determina l'infettività del virione
tat (transactivator)	p14/15 fattore attivante LTR
rev (regulator expression virion protein)	p19/20 fattore che regola la sintesi delle proteine virali
nef (negative factor)	p26/27 fattore che inibisce la sintesi delle proteine virali
LTR (Long Terminal Repeat)	non codifica proteine; controlla la trascrizione di tutti i geni virali

Tabella 7. Geni conosciuti dell'HIV e funzione delle proteine corrispondenti.

e verosimilmente con un ruolo di notevole importanza nella patogenesi dell'infezione (trasmissione, infettività e replicazione virale)(Feinberg, 1992).

L'HIV è stato isolato in vari liquidi biologici: sangue, liquido seminale, secreto vaginale, saliva, lacrime, latte materno. Tra questi, i primi 3 assumono rilievo quali vettori dell'infezione. La trasmissione dell'HIV avviene soprattutto in senso orizzontale, essenzialmente attraverso la via parenterale e la via sessuale, ma anche in senso verticale dalla madre al feto.

L'infezione da HIV e la conseguente progressiva distruzione delle difese immunitarie costituiscono la base patogenetica delle

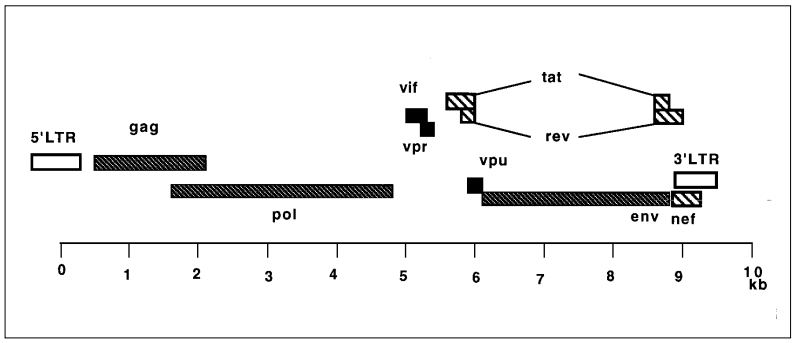


Figura 7. Organizzazione genomica del virus HIV.

gravi infezioni opportuniste e delle neoplasie che caratterizzano la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Il periodo dell'AIDS conclamato è preceduto dalla fase di infezione primaria, che decorre asintomatica in circa la metà dei pazienti, e da un lungo periodo di incubazione caratterizzato dalla diminuzione più o meno lenta del numero dei linfociti circolanti CD4+ e da linfoadenomegalia generalizzata (Volberding e Jacobson, 1992) (Fig. 8).

La grande maggioranza delle infezioni da HIV che configurano l'attuale pandemia sono sostenute da HIV-1, la cui epidemiologia è ben nota e diffusa in maniera cosmopolita in tutte le aree del mondo (Chin, 1992). L'HIV-2 mantiene a tutt'oggi un bacino di distribuzione essenzialmente limitato all'Africa (Markovitz, 1993).

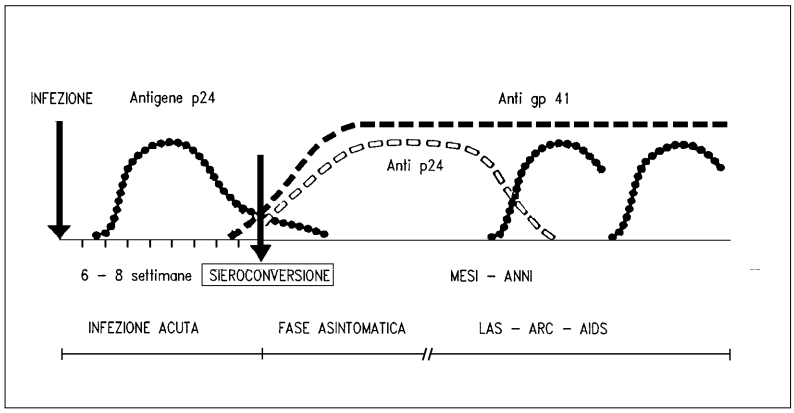


Figura 8. Sieroconversione e antigenemia nell'infezione da HIV.

2.2. Sistemi diagnostici

La possibilità di coltivare il virus HIV in vitro ha consentito, in un primo periodo, di allestire test di prima generazione per la determinazione degli anticorpi anti-HIV basati sull'impiego di lisati virali ottenuti da virus coltivati in linee umane di linfociti T. L'utilizzo del lisato totale virale come antigene si è però rivelato ben presto insufficiente, sia in temini di sensibilità clinica che di specificità, rispetto ad altri sistemi di riferimento quali ad esempio l'immunoblotting dello stesso lisato virale e la radioimmunoprecipitazione (RIPA) della glicoproteina gp160 (Constantine, 1993; Schochetman e George, 1992).

La necessità di una maggiore sensibilità e specificità dei test di screening, insieme all'incremento delle conoscenze sulla sierologia dell'infezione, hanno portato a test basati su antigeni ricombinanti. Numerosi studi sono stati, quindi, dedicati allo sviluppo di test di screening in formato ELISA indiretto, immobilizzando in fase solida polipeptidi ricombinanti con attività antigenica equivalente alla proteina strutturale gp160.

Fin dal 1982, sono stati introdotti nel sistema diagnostico immunoenzimatico peptidi sintetici per la ricerca di anticorpi in sieri umani. L'impiego di peptidi altamente specifici ha reso possibile la distinzione tra infezioni di sottotipi virali diversi (come nel caso della diagnosi di infezione da HIV-1 e HIV-2).

Esistono kit commerciali interamente basati su peptidi di sintesi per la rivelazione di anticorpi contro HIV-1 e HIV-2 (WHO, 1991). In questo tipo di kit l'uso di una serie di peptidi derivati da più epitopi e della lunghezza di soli 10-40 aminoacidi, permette di ovviare a problemi di variabilità antigenica e di cross-reattività.

Di seguito sono discussi i sistemi attualmente disponibili per la diagnosi di infezione da HIV (Tab. 8).

2.2.1. Ricerca di anticorpi specifici

La dimostrazione della presenza di anticorpi diretti contro proteine virali specifiche rappresenta il metodo più utilizzato per l'identificazione dei soggetti infetti con il virus HIV.

ANALISI INDIRETTA (anticorpi circolanti anti-HIV):	
	- ELISA (saggi immunoenzimatici)
	- Western Blot
	- RIPA (radioimmunoprecipitazione)
	- IFA (immunofluorescenza indiretta)
ANALISI DIRETTA :	
	- isolamento virale
	- microscopia elettronica
	- antigene sierico virale (Ag p24)
	- sonde genomiche (ibridazione in situ, dot blot, PCR, "branched DNA")

Tabella 8. Diagnosi di laboratorio dell'infezione da HIV.

- Test di screening (ELISA)

I saggi ELISA sono basati sull'utilizzo di antigeni virali (lisati virali, peptidi ricombinanti o sintetici), adesi su fase solida costituita da pozzetti di una micropiastra, biglie di plastica o carta, in genere nitrocellulosa. La maggior parte dei saggi disponibili sono di tipo indiretto. L'identificazione dell'avvenuto legame fra gli antigeni virali e gli anticorpi presenti nel siero in esame viene effettuata tramite un secondo anticorpo anti-IgG umano coniugato con un tracciante enzimatico. Esistono anche alcuni saggi di tipo competitivo (Fig. 9).

Alla fine del 1991 è stato approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) il primo test combinato HIV-1 / HIV-2. I test combinati di terza generazione utilizzano antigeni ricombinanti e / o sintetici per la determinazione contemporanea di anticorpi anti HIV-1 e -2. I campioni che risultano positivi al test combinato vengono valutati con un Western Blot specifico per anticorpi anti HIV-1 (vedi oltre). Nel caso si ottenga un risultato negativo o indeterminato il campione viene analizzato con un test specifico per anti-HIV-2. Recentemente sono stati sviluppati test WB combinati che utilizzano, oltre ad antigeni specifici dell'HIV-1 ottenuti da lisati virali, antigeni ricombinanti o peptidi sintetici specifici per l'HIV-2. I campioni che mostrano una reattività significativa verso entrambi i virus dovrebbero essere ulteriormente analizzati con tecnologie più sofisticate (basate, ad esempio, sull'utilizzo di sonde oligonucleotidiche specifiche).

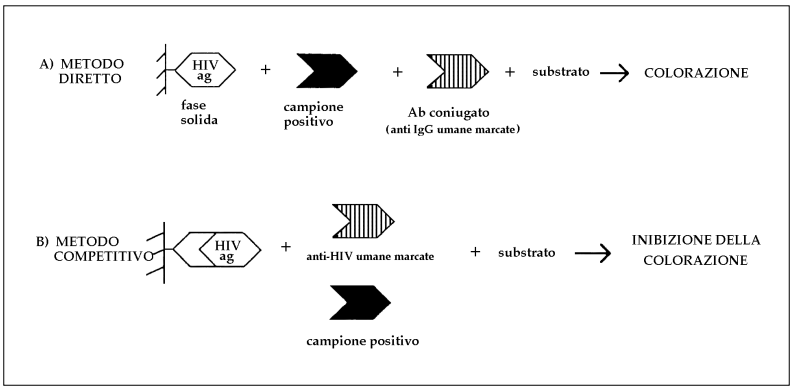


Figura 9. Schema di esecuzione del test immunoenzimatico (ELISA). (A): metodo del legame diretto (l'intensità del colore è proporzionale alla quantità di anti-HIV nel campione); B: metodo competitivo (l'intensità del colore è inversamente proporzionale alla quantità di anti-HIV nel campione).

- Test di conferma (Western Blot)

Il Western Blot (WB) rappresenta il test di conferma più utilizzato per la determinazione degli anticorpi anti-HIV. La specificità di questo test è più elevata di quella del test di screening e la sensibilità è almeno paragonabile; il suo costo e il maggior tempo richiesto per la sua esecuzione non lo rendono, tuttavia, adatto ad essere utilizzato come test di screening.

Il saggio WB utilizza come antigeni proteine virali, separate in base al loro peso molecolare mediante migrazione elettroforetica su gel di poliacrilammide e trasferite su striscie di nitrocellulosa. Sono disponibili commercialmente kit che forniscono queste striscie, utilizzate come fase solida, con adesi gli antigeni virali. Il siero da analizzare viene posto a contatto con la striscia e l'eventuale reazione antigene-anticorpo viene svelata mediante reazione immunoenzimatica (ELISA di tipo indiretto). Il risultato finale consiste nella formazione di un prodotto colorato (banda) in corrispondenza degli antigeni specifici riconosciuti dagli anticorpi presenti nel campione (Fig. 10). Il saggio WB permette in genere di evidenziare anticorpi

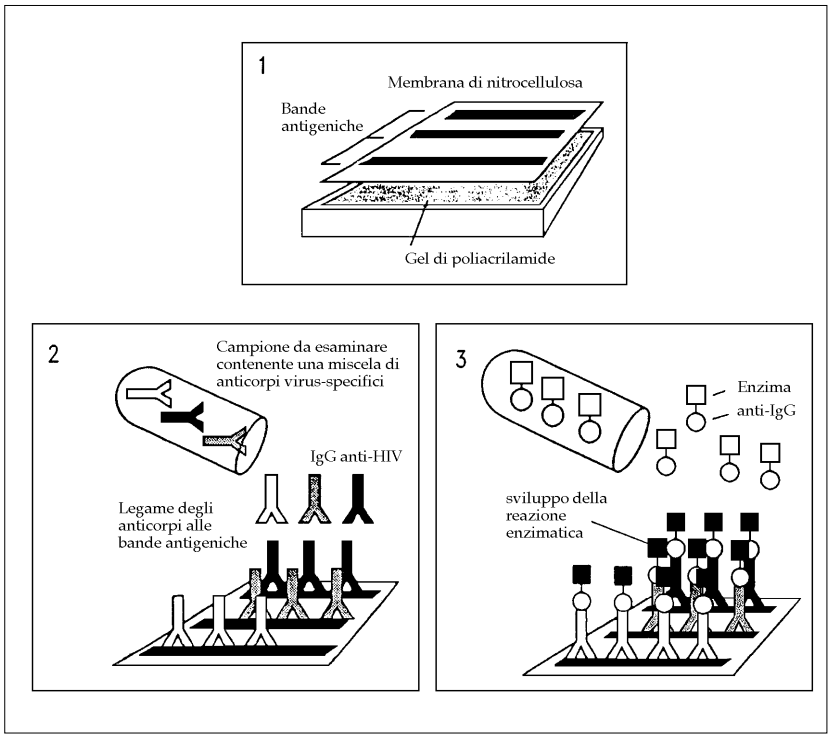


Figura 10. Schema di esecuzione della tecnica Western Blot (WB). (1) Gli antigeni del virus purificati sono separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide e le bande antigeniche vengono poi trasferite su una membrana di nitrocellulosa; (2) il siero del paziente viene depositato sulla membrana. Gli anticorpi specifici, se presenti, si legano alle corrispondenti bande antigeniche; (3) gli immunocomplessi sono rivelati mediante l'aggiunta di anticorpi anti-IgG umane marcate con un enzima. Dopo l'aggiunta di un cromogeno-substrato precipitante, si formano delle bande colorate in corrispondenza delle singole proteine virali.

diretti contro proteine prodotte dal gene *gag* (p18, p24, p55), dal gene *pol* (p31, p51, p66) e dal gene *env* (gp41, gp 120, gp160).

Attualmente non esiste un criterio universale per l'interpretazione dei risultati del test Western Blot. I criteri maggiormente accettati sono quelli stabiliti da:

- CDC (Center for Disease Control), secondo cui il test è positivo quando esiste reattività verso due delle seguenti proteine: p24, gp41, gp120 / 160;
- FDA (Food and Drug Administration), che classifica come positivi i campioni che presentano reattività per p24, p31 e gp41 o gp120 / 160;
- WHO (World Health Organization), che fornisce un risultato di positività in presenza di reattività verso due glicoproteine dell'envelope.

2.2.2. Determinazione dell'antigene circolante

L'antigene p24 (proteina del *core* del virus) può essere identificato nel siero dei soggetti infetti nel periodo che precede la sieroconversione e, generalmente, non è più determinabile durante la fase asintomatica. La sua persistenza o ricomparsa nel siero durante il corso dell'infezione viene considerata un indice prognostico sfavorevole. Il test per la determinazione dell'antigene può essere di valido aiuto in caso di un'infezione recente in un paziente sieronegativo, nel monitoraggio della malattia e / o della terapia e, infine, per la diagnosi di infezione nei neonati da madre sieropositiva.

La formazione di complessi tra l'antigene libero nel siero e l'anticorpo anti-p24 e la bassa carica virale, caratteristica soprattutto delle infezioni asintomatiche, sono probabilmente le principali cause della scarsa sensibilità di questo test. Bassi livelli sierici di antigene possono essere presenti anche quando il virus è in attiva replicazione. I test per la determinazione dell'antigene p24 non sono in grado di evidenziare quantità inferiori a 10 pg / ml. Recentemente è stata introdotta una procedura che prevede la dissociazione degli eventuali immunocomplessi prima di effettuare il test.

I test ELISA disponibili in commercio per la determinazione dell'antigene utilizzano anticorpi monoclonali murini adesi ad una fase solida e permettono un dosaggio quantitativo dell'antigene. Poichè la presenza di immunocomplessi o di sostanze in grado di interferire con la reazione possono provocare risultati falsamente positivi, i campioni reattivi vengono rianalizzati con un saggio di neutralizzazione. Un'aliquota del campione viene preincubata con un anticorpo specifico anti-p24 in grado di formare complessi con

l'antigene eventualmente presente. Il test per l'antigene viene ripetuto parallelamente su questa aliquota e sul campione non neutralizzato; se il campione è effettivamente reattivo, la densità ottica del campione dopo la neutralizzazione deve risultare ridotta almeno del 50% rispetto a quella dell'aliquota non neutralizzata.

2.2.3. Ricerca dell'acido nucleico virale

E' possibile dimostrare, in cellule infettate da HIV, la presenza dell'RNA virale o del DNA provirale, che viene prodotto in seguito alla trascrizione inversa dell'RNA e si integra nel genoma cellulare. Per la rivelazione degli acidi nucleici virali sono state inizialmente utilizzate tecniche di ibridazione molecolare basate su sonde di acidi nucleici, complementari all'RNA o al DNA del virus. Dato il numero esiguo di cellule infette presenti nei campioni biologici, la tecnica di amplificazione mediante reazione di polimerizzazione a catena (PCR) si è rivelata il metodo più efficace per la rivelazione della presenza delle sequenze virali (Ou e al., 1988; Butcher e Spadoro, 1992) E' stato stimato, infatti, che con questa tecnica sia possibile evidenziare la presenza di una singola copia di DNA provirale in un campione costituito da un milione di cellule non infettate. La presenza di forme virali circolanti può essere determinata mediante trascrizione inversa ed amplificazione dell'RNA genomico su campioni di siero o plasma.

L'identificazione diretta di sequenze virali può essere di valido aiuto (Fig. 11) per:

- una diagnosi precoce di infezione in soggetti sieronegativi (periodo finestra) (Hewlett e al., 1988);
- la risoluzione dei profili sierologici indeterminati (Jackson e al., 1990);
- il monitoraggio degli operatori sanitari con documentata esposizione a materiale potenzialmente infetto da HIV (Ippolito e al., 1993);
- la diagnosi precoce di infezione da HIV nei neonati di madre sieropositiva, nei quali gli anticorpi materni anti-HIV di classe IgG possono permanere sino a 15-18 mesi di età (The European Collaborative Study, 1992; Rogers e al., 1991).

La PCR è altamente sensibile e specifica ed il recente sviluppo di

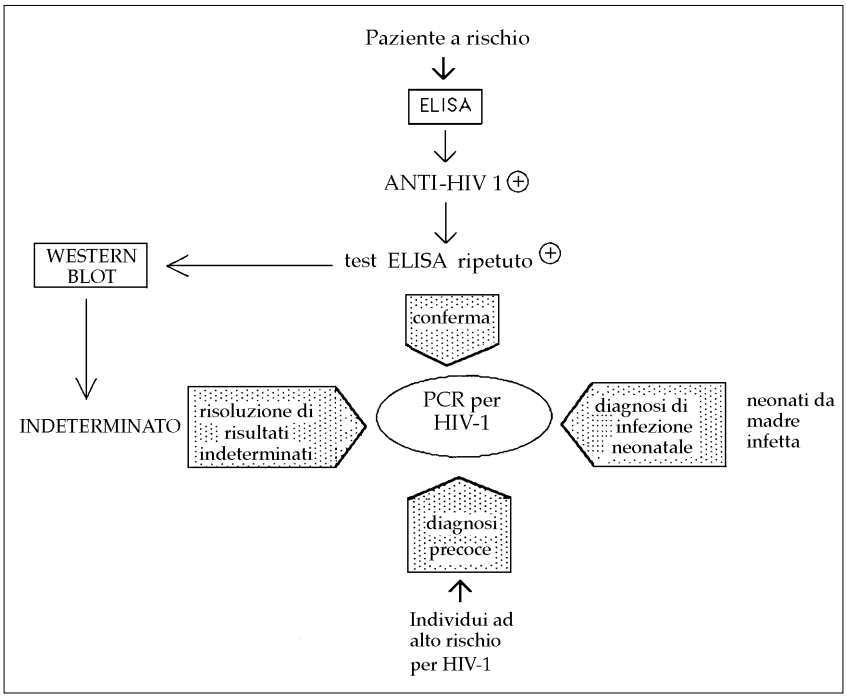


Figura 11. Applicazione della PCR per la diagnosi di infezione da HIV.

metodiche di esecuzione semplici e rapide ha permesso il suo trasferimento dal laboratorio di ricerca al laboratorio diagnostico. Recentemente sono stati introdotti in commercio kit che permettono, in modo semplice e rapido, l'identificazione del DNA provirale dell'HIV mediante: (a) la separazione e la lisi di cellule mononucleate a partire da sangue intero, (b) l'amplificazione del DNA provirale (nella regione *gag* del genoma, che presenta un elevato grado di conservazione) e (c) la rivelazione del prodotto amplificato.

Sono stati proposti anche test quantitativi per il monitoraggio della carica virale nel siero del soggetto infetto, necessari per una migliore valutazione dello stato clinico del paziente e dell'efficacia del trattamento terapeutico o di possibili vaccini. Questi metodi sono principalmente basati su sistemi di PCR (Sninsky e Kwok, 1993) quantitativa (con utilizzo di uno standard interno); recentemente è stato anche messo a punto un sistema di amplificazione del segnale

(*branched DNA*) in grado di determinare e quantificare direttamente gli acidi nucleici, sia DNA che RNA, mediante l'utilizzo di sonde marcate con fosfatasi alcalina e di un substrato chemioluminescente, in un sistema a micropiastra (Urdea, 1993).

Ulteriori informazioni, di grande utilità clinica, potranno derivare dalla possibilità di identificare i virus mutanti resistenti al trattamento terapeutico con tecniche di PCR e ibridazione differenziale (ovvero con l'utilizzo di sonde specifiche con sequenze complementari alle regioni genomiche mutate), attualmente in fase di studio (Kellam e al., 1992).

3. Diagnosi di infezione da HTLV

3.1. Premessa

Gli *human T-lymphotropic virus type I* (HTLV-I) e *type II* (HTLV-II) costituiscono i prototipi di retrovirus umani. Il primo è stato associato alla comparsa di leucemia/linfoma delle cellule T (ATLL) e di paraparesi spastica tropicale (HAM/TSP), mentre la reale patogenicità del secondo, pur isolato per la prima volta in un paziente con una variante di *hairy cell leukemia*, è tutt'ora oggetto di indagine.

Le modalità di trasmissione sono analoghe a quelle del virus HIV e la distribuzione geografica è eterogenea, con aree di iperendemia (Giappone, Africa intertropicale, Caraibi) ed aree a bassa prevalenza di infezione (Manns e Blattner, 1991).

L'analisi molecolare del genoma ha dimostrato che l'HTLV contiene, come gli altri retrovirus, i geni gag, pol e env. Vicino al gene env è stata individuata una regione definita pX che presenta almeno due geni: tax e rex, che codificano per proteine non strutturali essenziali per la replicazione virale (Hjelle, 1991).

Il genoma dell'HTLV non codifica per alcun oncogene e non è in grado di trasformare le cellule integrandosi in siti specifici del genoma dell'ospite.

3.2. Sistemi diagnostici

3.2.1. Ricerca di anticorpi specifici

La ricerca di anticorpi specifici diretti verso proteine virali è il metodo più utilizzato per identificare i soggetti venuti a contatto con i virus HTLV-I e HTLV-II.

La determinazione degli anticorpi anti HTLV-I è stata inizialmente effettuata mediante l'impiego di saggi in immunofluorescenza

(IFA) a cui si sono successivamente affiancati test immunoenzimatici (EIA) e di agglutinazione passiva (PA) (Constantine e al., 1992).

Con gli attuali test di screening non è possibile una distinzione fra infezione da HTLV-I e HTLV-II a causa dell'ampia reattività crociata tra i due virus derivante dalla considerevole analogia genomica (circa il 58% di analogia per la p19, circa il 63% per la gp46, circa il 79% per la gp21 e circa l'85% per la p24).

La presenza del virus può essere evidenziata dopo infezione di colture cellulari dove viene determinata, a livello del supernatante, la presenza dell'attività della trascrittasi inversa, enzima espresso esclusivamente dai retrovirus. Il metodo, poco maneggevole, può essere utilizzato solo da laboratori specializzati e richiede dai 7 ai 21 giorni perchè si sviluppi una apprezzabile concentrazione dell'enzima.

- Test di screening (ELISA)

Attualmente per la ricerca degli anticorpi anti-HTLV vengono impiegati metodi ELISA a legame diretto, nel quale il complesso antigene virale-anticorpo sierico viene riconosciuto da un anticorpo anti-IgG marcato con un enzima, oppure con test ELISA competitivi, nei quali gli anticorpi presenti nel campione competono con anticorpi marcati per legarsi agli antigeni virali.

I test sopra menzionati utilizzano, adese alla fase solida, proteine da lisato virale inattivato e purificato di HTLV-I, per cui essi dimostrano una buona sensibilità nello svelare anticorpi diretti contro questo virus, mentre la capacità di identificare anticorpi anti-HTLV-II è estremamente variabile in funzione del kit commerciale utilizzato (Kline e al., 1991).

A tale proposito è stato recentemente messo a punto un test ELISA di screening che è stato ottimizzato per la ricerca degli anticorpi anti-HTLV-I e II; tale test utilizza antigeni da lisato virale di HTLV-I ed antigeni ricombinanti specifici per HTLV-I e HTLV-II, corrispondenti a regioni dell'envelope per le quali l'analogia tra i due virus è minima o assente (Figg. 12 e 13).

Sono stati inoltre prodotti kit che utilizzano, come reattivo antigenico, peptidi sintetici corrispondenti a regioni dell'envelope (Shih e al., 1991; Viscidi e al., 1991). L'impiego di peptidi sintetici riduce notevolmente le reazioni aspecifiche dovute alla cross-reattività del campione in esame verso componenti antigeniche cellulari derivanti dalle colture da cui è stato ottenuto il virus; analoghi risultati si

Figura 12. Organizzazione genomica di HTLV e percentuali di omologia fra le diverse proteine codificate dai geni gag, env, tax e rex.

Figura 13. Schema di esecuzione del test ELISA per la ricerca degli anticorpi anti-HTLV-I e II.

ottengono con gli ELISA che utilizzano antigeni ottenuti con la tecnica del DNA ricombinante.

- Test di conferma (Western Blot)

L'impiego di test di screening presuppone la disponibilità di saggi supplementari "di conferma", possibilmente anche in grado di discriminare tra HTLV-I e HTLV-II.

Attualmente il test supplementare più comunemente impiegato

è il Western Blot (WB) in quanto altri saggi, quali la radioimmunoprecipitazione (RIPA), che è un test difficoltoso, costoso e che necessita della marcatura radioimmunologica dell'antigene in coltura, sono effettuati in pochissimi laboratori.

I primi test di WB sviluppati utilizzavano antigeni da lisato virale HTLV-I purificato solo parzialmente. Gli antigeni venivano separati elettroforeticamente tramite gel di poliacrilamide / SDS e trasferiti su membrane di nitrocellulosa. Il limite di questi test era dato dalla scarsa sensibilità per la determinazione di anticorpi contro le glicoproteine dell'envelope gp46 e gp21, difficilmente evidenziabili, in quanto la quasi totalità dei soggetti infettati da HTLV-I e HTLV-II ha anticorpi anti-p24 e anti-p19 che mascherano la reattività verso questa banda. Questo limite era invece superato dall'impiego della tecnica RIPA che presenta una maggiore sensibilità verso le proteine dell'envelope.

Recentemente è stata ottenuta, con la tecnica del DNA ricombinante, una glicoproteina (rgp21) che permette di incrementare la sensibilità del WB, che risulta pertanto paragonabile a quella ottenibile col test RIPA.

In seguito alle numerose segnalazioni di soggetti HTLV-II positivi nei gruppi ad alto rischio negli USA, in Europa e anche in Italia, è apparsa evidente l'utilità di allestire un WB capace di discriminare tra HTLV-I e HTLV-II. A tale scopo è stato messo a punto un WB che utilizza, oltre all'rgp21, anche un antigene ricombinante specifico per la determinazione degli anticorpi anti-HTLV-I diretti contro la gp46. In base a queste modifiche, il test è in grado di dare una conferma di positività per HTLV-I (rgp46 reattivo) e anche di essere indicativo per HTLV-II (rgp46 non reattivo) (Wiktor e al., 1990).

Recentemente, infine, si è reso disponibile un WB che comprende, oltre agli antigeni della versione precedente, anche un antigene ricombinante dell'envelope (rgp46) specifico per HTLV-II e un controllo interno per la conferma di una corretta operatività. Questa versione permette sia la conferma di positività ai test di screening sia la differenziazione tra HTLV-I e HTLV-II (Fig. 14).

Pertanto, in base ai test oggi disponibili, il procedimento operativo consigliabile per la diagnostica sierologica delle infezioni da HTLV-I e HTLV-II è quello che prevede l'impiego di un test di screening capace di identificare anticorpi diretti verso entrambi i virus. I campioni ripetutamente reattivi ai test ELISA di screening devono poi essere valutati con il test supplementare WB di ultima generazione e / o con la radioimmunoprecipitazione (RIPA).

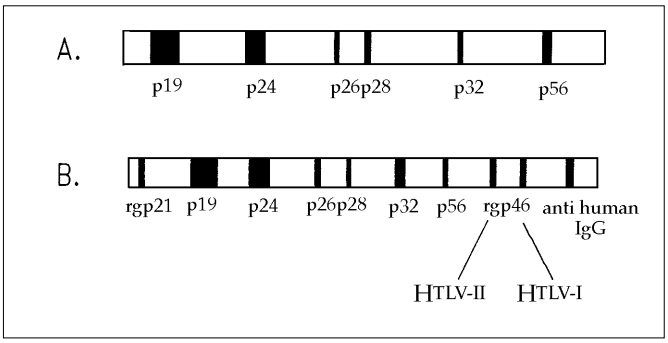


Figura 14. Striscie di nitrocellulosa impiegate nella tecnica di Western Blot per la determinazione degli anticorpi anti-HTLV. (A) antigeni impiegati nella prima versione di Western Blot derivati dal lisato virale HTLV-I purificato solo parzialmente; (B) ultima versione di Western Blot con un antigene ricombinante specifico per HTLV-II.

I criteri di interpretazione del WB prevedono che il test classifichi come positivi i campioni che presentano una banda di reattività per env (precursore gp62/68 o glicoproteina dell'envelope gp46) e una banda per gag (core p24 o matrice p19); tutti gli altri pattern di reattività sono indeterminati.

3.2.2. Ricerca dell'acido nucleico virale

Attualmente, nonostante il supporto dei test WB e RIPA, si ritiene che la diagnosi sierologica dell'infezione da HTLV-II debba essere confermata con metodica di amplificazione genica (PCR), che rappresenta al momento l'unico sistema diagnostico che permette di distinguere con sicurezza l'infezione HTLV-I da quella da HTLV-II (Wattel e al., 1991; Kwok e al., 1990).

La ricerca del genoma virale integrato nei linfociti del sangue periferico viene eseguita mediante PCR, utilizzando come *primers* sequenze genomiche della regione tax/rex che permettono di rivelare entrambi i retrovirus. La discriminazione tra HTLV-I e HTLV-II può essere effettuata utilizzando i due enzimi di restrizione Sau 3A

e Taq I. L'enzima Sau 3A permette di ottenere una sequenza di 120 nucleotidi specifica per HTLV-I, mentre Taq I digerisce l'acido nucleico di entrambi i virus generando due sequenze nucleotidiche distinte (138 nucleotidi per HTLV-I e 85 per HTLV-II).

Un altro sistema di rivelazione consiste nell'ibridazione dei frammenti amplificati, precedentemente separati su gel d'agarosio e trasferiti su filtro, con sonde oligonucleotidiche specifiche per HTLV-I e -II marcate con ^{32}P.

Queste tecniche si sono però rivelate estremamente indaginose e quindi poco applicabili ad un laboratorio di routine: per tale motivo, negli ultimi anni, si sono sviluppati sistemi di rivelazione simili ai comuni metodi immunoenzimatici sia nei principi analitici che nel formato. Tali metodi sono basati sulla cattura del prodotto di PCR mediante sonde oligonucleotidiche specifiche per HTLV-I e II, immobilizzate su una micropiastra per adsorbimento passivo o mediante un ponte biotina / avidina; la marcatura (non isotopica) di uno dei componenti della reazione di amplificazione, o l'utilizzo di anticorpi anti-DNA a doppia elica, permette la rivelazione dell'ibrido specifico DNA / DNA. L'impiego di questi sistemi permette in modo semplice e rapido di identificare e discriminare i due virus.

Bibliografia

1) Brigati, D.J., Myerson, D., Leary, J.J., Spalholz, B., Travis, S.Z., Fong, C.K.Y., Hsiuhg, G.D., Ward, D.C.: Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue section using biotin-labeled hybridization probes. Virology 1983; 126:32.

2) Butcher, A., Spadoro, J. : Using PCR for detecting HIV-1 infection. Clin. Immunol. Newslett. 1992; 12:73-76.

3) Cheab, F.F., Kan, Y.W.: Detection of specific DNA sequences fluorescence amplification: a color complemantation assay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86:9178-82.

4) Chin, J.: Present and future dimensions of the HIV/AIDS pandemic. Science Challenging AIDS (Rossi G.B., Beth-Giraldo E., Chieco-Bianchi L., Dianzani F., Giraldo G., Verani P. eds) Karger Basel, 1992; 33-50.

5) Constantine, N.T.: Serological tests for the retroviruses: approaching a decade of evolution. AIDS 1993; 7:1-13.

6) Constantine, N.T., Callahan J.D., Watts D.M.: Retroviral testing: Essential for Quality Control and Laboratory Diagnosis. Boca Raton, CRC Press Inc., 1992; 1-220.

7) Feinberg, M.B.: The molecular biology and pathogenesis of HIV-1 infection. Curr. Opinion in Infectious Diseases 1992; 5:214-220.

8) Gallina, A., Milanesi, G.: Gli antigeni ricombinanti come strumenti diagnostici. In “Le biotecnologie nella microbiologia medica”. Esculapio edit., Bologna, 1992.

9) Greene, W.C.: The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. New Engl. J. Med. 1991; 324:308-317.

10) Grossi, M.P., Caputo, A., Zucchini, S., Bozzini, R., Marconi, P.C., Manservigi, R., Barbanti-Brodano, G., Balboni P.G.: Molecular approaches to inhibit HIV-1 tat expression and functions. In:

Generation of antibodies by cell and gene immortalization. Terhorst, C., Malavasi, F., Albertini, A. (eds), Karger, 1993.

11) Hewlett, I.K., Gregg, R.A., Mayner R.E.: Detection of HIV proviral DNA and p24 antigen in plasma prior to seroconversion. IV Int. Conf. AIDS 1988; 1:137.

12) Hjelle, B.: Human T-cell leukemia / lymphoma virus, Life cycle, pathogenicity, and diagnosis. Arch. Pathol. Lab. Med. 1991; 440-450.

13) Houghten, R.A., Pinilla, C., Blondelle, S.E., Appel, J.R., Dooley, C.T., Cuervo, J.H.: Generation and use of synthetic peptide combinatiorial libriaries for basic research and drug discovery. Nature 1991; 354:84-86.

14) Ippolito,G., Puro, V., De Carli G.: Infezione professionale da HIV in operatori sanitari: descrizione dei casi con sieroconversione documentata segnalati al 30 giugno 1993. Giornale Italiano dell'AIDS 1993; 4, 2: 63-75.

15) Jablonsky, E., Moomaw, E.W., Tullis, R.H., Ruth, J.L.: Preparation of oligodeoxynucleotide-alkaline phosphatase conjugates and their use as hybridization probes. Nucleic Acid Res. 1984; 14:6155-6128.

16) Jackson J.B., Mac Donald K.L., Cadwell J. et al.: Absence of HIV infection in blood donors with indeterminate Western blot tests for anti-HIV-1. N. Engl. J. Med. 1990; 322: 217-222.

17) Keller, G.H., Huang, D.P., Manak, M.M.: A sensitive non-isotopic hybridization assay for HIV-1 DNA. Anal. Biochem. 1989; 177:27-32.

18) Kellam, P., Boucher, C.A.B., Larder, B.A.: Fifth mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89:1934-1938.

19) Kemp, D.J., Smith, D.B., Foote, S.J.: Colorimetric detection of specific DNA segment amplified by polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86:2423-7.

20) Kline, R.L., Brothers, T., Halsey, N., Boulos, R., Lairmore, M.D.,

Quinn, T.C.: Evaluation of enzyme immunoassays for antibody to human T-lymphotropic viruses type I/II. Lancet 1991; 337: 30-33.

21) Kohler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256:495.

22) Kwok, S., Gallo, D., Hanson, C.: High prevalence of HTLV-II among intravenous drug abusers: PCR confirmation and typing. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1990; 6: 561-565.

23) Lam, K.S., Salmon, S.E., Hersh, E.M., Hruby, V.J., Kazmierski, W.M., Knapp, R.J.: A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. Nature 1991; 354: 82-84.

24) Longo, M.C., Beringer, M.S., Hartley, J.L.: Use of uracil DNA glycosilase to control carry-over contamination in polymarase chain reactions. Gene 1993; 125-128.

25) Manns, A., Blattner, W.A.: The epidemiology of the human T-cell lymphotropic virus type I and type II: etiological role in human disease. Tranfusion 1991; 31:67-75.

26) Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

27) Mantero, G., Zonaro, A., Bertolo, P., Primi, D.: DNA Enzyme Immunoassay: a general method for detecting polymerase chain reaction products. Clin. Chem. 1991; 37:422-429.

28) Markovitz, D.M.: Infection with the Human Immunodeficiency Virus type 2. Ann. Intern. Med. 1993; 118:211-218.

29) Meulemans, E., Vandevyver, C., Volckaert, G., Raus, J.: The construction of a mouse/human chimeric antibody against human breast cancer cells. In: Generation of antibodies by cell and gene immortalization. Terhorst, C., Malavasi, F., Albertini, A. (eds), Karger, 1993.

30) Mullis, K.B., and Faloona, F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. Methods Enzymol. 1987; 155:335-350.

31) Ou, C.Y., Knok, S., Mitchell, S.W., Mack, D.H., Sninsky, J.J., Feorino, P., Warfield, D., Schochetman, G.: DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. Science 1988; 239: 295-297.

32) Renz, M., Kurz, C.: A colorimetric method for DNA hybridization. Nucleic Acid. Res. 1983; 12:3435-3444.

33) Ripalti, A.: Gli antigeni sintetici. In "Le biotecnologie nella microbiologia medica". Esculapio edit., Bologna, 1992.

34) Rogers, M.F., Ou, C., Kilbourne, B.: Advances and problems in the diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infants. Pediatr. Infect. Dis. J. 1991; 10: 523.

35) Saiki, R.K., Gelfant, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487-4918.

36) Schochetman, G., George, J.R. (eds): AIDS testing: Methodology and Management Issues. new York, Springer-Verlag, 1992.

37) Scott, J.K., Smith, G.P.: Searching for peptide ligands with an epitope library. Science 1990; 249: 386-390.

38) Shih, J., O'Donnell, D., Delancey, S., Mann, T., Lee, H.: Differentiation of HTLV-II using synthetic peptides from immunodominant regions of HTLV Env proteins. Transfusion 31 (suppl): S8, 1991.

39) Sninsky, J.J., Kwok, S.: The application of quantitative polymerase chain reaction to therapeutic monitoring. AIDS 1993; 7 (Suppl. 2): S29-S34.

40) Stern, P.S.: Predicting antigenic sites on proteins. Trends in Biotechnology 1991; 9:163-169.

41) Swaminathan, B., Prakash, G.: Nucleic acid and monoclonal antibody probes. M. Dekker edit., New York-Basel, 1989.

42) Tchen, P., Fuchs, R.P.P.,Sage, E., Leng, M.: Chemically modified nucleic acids as immunodetectable probes in hybridization experiments. Proc. Natl. Acad. Sci.USA 1984; 81:3466-3470.

43) The European Collaborative Study. Risk factors for mother to child transmission of human immunodeficiency virus type 1. Lancet 1992; 339: 1007.

44) Thein, S.L., Wallace, R.B.: The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In Human genetic diseases: a practical approach (ed.K.E.Davis), p.33-50. IRA Press, Herndon, Virginia, 1986.

45) Thomas, P.S.: Hybridization of denaturated RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980; 77: 5201-5205.

46) Urdea, W.: Synthesis and characterization of branched DNA (bDNA) for the direct and quantitative detection of CMV, HBV, HCV and HIV. Clin. Chem. 1993; 39:725-726.

47) Van Regenmortel, M.H.V., Neurath, A.R.: Immunochemistry of viruses II. Elsevier eds, 1990.

48) Viscidi, R.P., Hill, P.M., Li, S., Cerny, E.H., Vlahov, D., Farzadegan, H., Halsey, N., Kelen, G.D., Quinn, T.C.: Diagnosis and differentiation of HTLV-I and HTLV-II infection by enzyme immunoassay using synthetic peptides. J. AIDS 1991; 4: 1190.

49) Vogelstein, B., and Gillespie, D.: RNA-DNA hybridization in solution without DNA reannealing. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1977; 28: 550-557.

50) Volberding, P.A., Jacobson, M.A.: AIDS clinical rewiew, Marcel Dekker, New York, 1992.

51) Wattel, E., Mariotti, M., Rouger, P. et al.: Place de la PCR dans le diagnostic de l'infection par le virus HTLV-I/II. Res. Fr. Transfus. Hemobiol. 1991; 34: 275-278.

52) Weber, T., Hunsmann , Stevens, W., Fleming, A.F.: Human retrovirus. Bailliere's Haematology 1992; 5:273-314.

53) Wiktor, S.Z., Alexander, S.S. , Shaw, G.M. et al.: Distinguishing between HTLV-I and HTLV-II by Western blot. Lancet 1990; 335: 1533.

54) World Health Organization: operational characteristics of commercially available assays to HIV-1 and / or HIV-2. Geneva:WHO (Report 4, GPA / BMR / 91.6), 1991.

Indice

Editoriale ..... pag. 3
1. Le Biotecnologie nella diagnostica infettivologica..... » 5
1.1. Premessa..... » 5
1.2. Reagenti biotecnologici ..... » 7
1.2.1. Gli antigeni ..... » 7
-Antigeni ricombinanti..... » 7
-Espressione in E.Coli..... » 9
Espressione in lievito..... » 11
Espressione in cellule di eucarioti superiori ..... » 13
-Antigeni sintetici..... » 16
-Criteri per la scelta di peptidi ..... » 18
-Librerie peptidiche ..... » 21
Librerie di peptidi sintetici ..... » 21
Librerie di peptidi ricombinanti ..... » 22
1.2.2. Le sonde..... » 23
-Le sonde molecolari (anticorpi monoclonali)..... » 23
- Le sonde genetiche ..... » 25
1.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)..... » 28
2. Diagnosi dell'infezione da HIV ..... » 31
2.1. Premessa..... » 31
2.2 Sistemi diagnostici ..... » 35
2.2.1. Ricerca di anticorpi specifici ..... » 35
-Test di screening (ELISA)..... » 36
-Test di conferma (Western Blot)..... » 37
2.2.2. Determinazione dell'antigene circolante ..... » 39
2.2.3. Ricerca dell'acido nucleico virale..... » 40
3. Diagnosi dell'infezione da HTLV ..... » 43
3.1 Premessa..... » 43
3.2 Sistemi diagnostici ..... » 43
3.2.1. Ricerca di anticorpi specifici ..... » 43
-Test di screening (ELISA)..... » 44
-Test di conferma (Western Blot)..... » 45
3.2.2. Ricerca dell'acido nucleico virale..... » 47
Bibliografia ..... » 49
Indice ..... » 55

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 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.**

EDITORE

Caleidoscopio

Rivista mensile di Medicina

anno 13, numero 97

user
KNIGHT-RIDDER INFORMATION

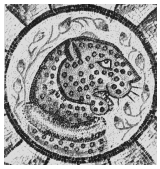
Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0360 509973
E-mail:rassu@mbox.vol.it

Responsabile Commerciale
Alessandra Pater

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) 803498- 809070.
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: 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 Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Ottobre 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)