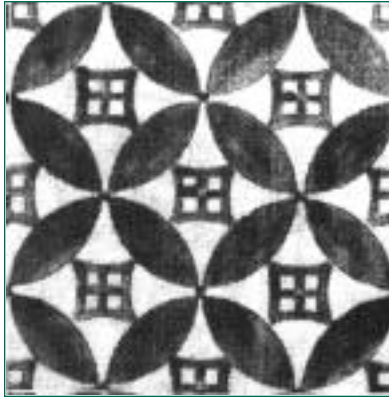


Caleidoscopio

Italiano



Serie Mosaici Romani

Riccardo Morganti
Mauro Pistello
Marialinda Vatteroni

Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali

Ruolo del laboratorio di virologia

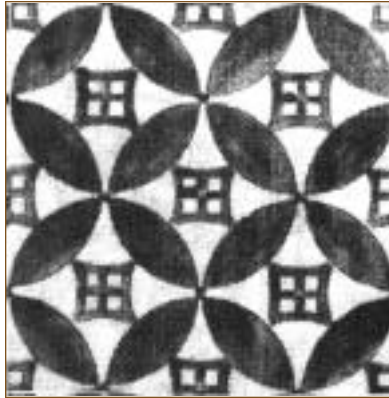
Direttore Responsabile
Sergio Rassu

129

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1999

Caleidoscopio

Italiano



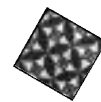
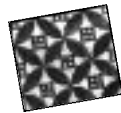
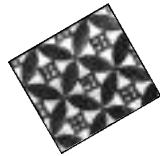
Serie Mosaici Romani

Riccardo Morganti
Mauro Pistello
Marialinda Vatteroni

Unità Operativa di Virologia
Azienda Ospedaliera
Pisa

Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali

Ruolo del laboratorio di virologia



129

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1999

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh.

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

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

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 Rassa
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Caleidoscopio

Italiano

Editoriale

Le infezioni virali possono essere affrontate con diversi interventi che comprendono i vaccini (preventivi, terapeutici e perinatali), la sieroterapia e la chemioterapia.

Qualunque sia il tipo di intervento attuabile o scelto, è importante la valutazione del paziente e soprattutto dello stato dell'infezione. Nel caso infatti in cui l'opzione sia rappresentata dalla chemioterapia dell'infezione in atto, è fondamentale valutare la risposta anche in considerazione del fatto che i farmaci antivirali utilizzati si associano ad effetti collaterali non irrilevanti e possono essere costosi.

Probabilmente quest'ultimo aspetto, che per una mancata attenzione dei sanitari passa inosservato, dovrebbe invece richiedere una considerazione maggiore se si tiene conto che il 20% del budget della spesa farmaceutica di una Azienda Ospedaliera può essere tranquillamente assorbito per l'acquisto di farmaci antivirali per il trattamento di due sole condizioni patologiche: l'AIDS e le epatopatie croniche di eziologia virale. Una situazione a dir poco allarmante se si tiene conto che questa spesa è destinata ad aumentare con l'incremento della terapia e delle indicazioni al trattamento antivirale.

Il laboratorio quindi può essere estremamente prezioso a questo scopo e la razionalizzazione della terapia attraverso un obiettivo monitoraggio dei risultati ottenuti costituisce un obbligo per tutti noi.

Questa monografia, prendendo lo spunto da questa situazione finisce per sintetizzare quelle che sono oggi le metodiche diagnostiche in campo virologico: ricerca di antigeni virali, PCR, NASBA, bDNA, sistema a cattura di ibrido, genotipizzazione, offrendo un quadro completo, sintetico e chiaro.

Le infezioni virali prese in esame in questa monografia sono le più rilevanti sia dal punto di vista epidemiologico che terapeutico: le infezioni da HIV-1, da HCV e da CMV.

Il Dr. Riccardo Morganti, che abbiamo già avuto modo di conoscere ed apprezzare quale Autore del Caleidoscopio dedicato alla "Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali", è laureato in Scienze Biologiche e Specialista in Microbiologia e Virologia.

Ha frequentato prima i laboratori dell'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro e quindi quelli dell'Istituto di Biologia Cellulare del CNR di Roma per approfondire le conoscenze sulle tecniche di biologia molecolare applicate alla diagnostica.

Ha insegnato per alcuni anni Strumentazione di Laboratorio e Patologia molecolare presso la Scuola per Tecnici di Laboratorio dell'Azienda Ospedaliera di Pisa e collabora all'insegnamento di Tecniche virologiche presso il Corso di Diploma Universitario per Tecnici di Laboratorio Biomedico dell'Università di Pisa. Attualmente presta servizio presso l'U.O. Universitaria di Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Pisa. E' autore di oltre 50 tra pubblicazioni su riviste e comunicazioni a congressi.

Il Dr. Mauro Pistello è laureato in Scienze Biologiche e Dottore di Ricerca in Immunobiologia dei virus. Durante Il Dottorato di Ricerca ha frequentato il Laboratory of Virology, Department of Virology, Institute of Infectious Diseases and Immunology, Veterinary Faculty, State University of Utrecht (NL) e Il Major Research Council Laboratory, Department of Veterinary Pathology, Veterinary School, University of Glasgow (UK).

Attualmente è Ricercatore universitario presso il Dipartimento di Biomedicina Sperimentale Infettiva e Pubblica dell'Università di Pisa e svolge attività assistenziale in qualità di Ricercatore universitario presso l'U.O. Universitaria di Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Pisa.

Nel 1996 è risultato vincitore del premio G. B. Rossi quale miglior giovane ricercatore italiano distintosi nel campo della ricerca sull'AIDS nel 1995. E' socio di Istituti e Società scientifiche di rilievo internazionale ed è autore di oltre 70 pubblicazioni e 100 comunicazioni a congressi.

La Dr.ssa Marialinda Vatteroni è laureata in Medicina e Chirurgia, Specialista in Ematologia e Dottore di Ricerca in Patologia Sperimentale e Molecolare. Per circa un anno ha lavorato in Francia nei laboratori di ricerca dell'Unità 25 INSERM diretta dal Prof. Jean Hamburger, sotto la guida dei Prof. Jean F. Bach e Martine Papiernik, usufruendo di due borse di studio CNR/INSERM, ha quindi frequentato i laboratori dell'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova allo scopo di approfondire le conoscenze sulle biotecnologie. Attualmente è Dirigente di I livello presso l'U.O. Universitaria di Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Pisa. E' autrice di oltre 60 tra pubblicazioni su riviste nazionali ed internazionali e comunicazioni a congressi.

Sergio Rassu

Introduzione

Sebbene numerose ed importanti infezioni e malattie virali che colpiscono l'infanzia e gli adulti possano essere prevenute o controllate efficacemente attraverso l'impiego di vaccini e/o sieri opportuni, alcune di esse, per diverse ragioni, non possono essere combattute con tali mezzi.

Ne sono un esempio le affezioni sostenute dai rinovirus, dal citomegalovirus (CMV) e da altri virus erpetici, dal virus dell'immunodeficienza umana tipo 1 (HIV-1) e da altri retrovirus, dal virus dell'epatite C (HCV) e da diversi agenti virali presenti in aree tropicali e subtropicali come pure, per certi versi, dai virus influenzali (Bendinelli et al, 1992).

I principali ostacoli all'impiego di vaccini e/o di sieri per combattere determinate infezioni e malattie virali sono rappresentati dalla proprietà che alcuni virus posseggono di produrre infezioni latenti come i virus erpetici, alcuni virus dell'epatite e i retrovirus, dalla capacità di andare incontro a cambiamenti antigenici come HIV-1 ed i virus influenzali ed anche dalla molteplicità dei sierotipi presentata da alcuni virus come i rinovirus e i togavirus.

Per il controllo delle malattie virali per le quali non sono realizzabili immunoprofilassi ed immunoterapie efficaci, numerosi sforzi sono stati e vengono attualmente compiuti al fine di individuare farmaci in grado di interferire con la moltiplicazione virale la quale, direttamente o indirettamente, rappresenta la causa del danno a carico dell'ospite.

Il farmaco antivirale ideale dovrebbe essere in grado da un lato di arrestare la moltiplicazione virale prima che questa raggiunga un'estensione critica e, dall'altro, di ripristinare le funzioni compromesse nelle cellule infettate senza esercitare nel contempo azioni tossiche di rilievo nei riguardi dell'ospite.

Purtroppo non esiste attualmente alcun farmaco dotato di queste caratteristiche ed è verosimile che anche in futuro difficilmente si possa disporre di una sostanza che, grazie alla sua azione, consenta di recuperare le cellule infettate; infatti la compromissione di macromolecole e di funzioni cellulari avviene precocemente nella maggior parte delle infezioni virali.

Inoltre, data la particolare biologia dei virus, esistono difficoltà consistenti per ottenere l'inibizione selettiva di funzioni virali senza che vengano intaccate quelle cellulari; infatti a differenza di quanto è possibile nel controllo della moltiplicazione e della vitalità dei batteri (dove i bersagli sono rappresentati da caratteristiche metaboliche, strutturali e molecolari che si diversificano significativamente da quelle presentate dalle cellule animali), nel controllo della moltiplicazione virale i punti di attacco differenziale sono

limitati dal fatto che la replicazione virale* è la risultante dell'espressione di geni virali e cellulari.

Infine, in analogia con quanto avviene nel trattamento chemioterapico delle infezioni batteriche, un'altra importante limitazione della terapia antivirale è costituita dall'insorgenza di mutanti resistenti; come pure in quel caso, la loro selezione sarà impedita o rallentata facendo riferimento agli stessi principi: dosaggio adeguato dei farmaci, impiego di più sostanze ove possibile, somministrazione solo nei casi chiaramente diagnosticati, ecc.

L'interesse nei confronti della chemioterapia antivirale risale agli anni '50 in seguito alla scoperta di agenti antitumorali in grado di inibire la sintesi del DNA e all'individuazione di composti che producevano lo stesso effetto sul DNA virale (Bean, 1992). I primi farmaci antivirali, il tiosemicarbazone e la iodoxuridina, sono stati somministrati negli anni '60. Verso la fine degli anni '70 è stato prodotto e impiegato nel trattamento di numerose infezioni da virus erpetici l'acyclovir, il primo farmaco non tossico per l'uomo.

I progressi, tuttavia, sono risultati lenti per la difficoltà di selezionare composti capaci di interferire solo con la replicazione virale.

L'epidemia di AIDS della fine degli anni '80 e dell'inizio degli anni '90 e la scoperta di protocolli terapeutici per il trattamento delle epatiti croniche da HCV hanno generato da un lato un forte incremento nello sviluppo, nella produzione e nell'impiego dei farmaci antivirali e dall'altro la conseguente necessità di selezionare agenti effettivamente più attivi nonché meno tossici e terapie, combinate e non, più efficaci.

In questo contesto il laboratorio di virologia acquista un ruolo importante poiché è in grado di fornire ai clinici informazioni quali il valore della carica virale, di particolare rilevanza nel monitoraggio dell'efficacia della terapia.

In genere nei laboratori di virologia clinica vengono effettuate indagini per monitorare l'efficacia del trattamento chemioterapico soprattutto delle infezioni da HIV-1, da CMV in quanto agente opportunistico nei pazienti immunocompromessi e da HCV.

*Il ciclo di replicazione virale si divide in varie fasi:

- 1 - adsorbimento del virione alla superficie della cellula ospite;
- 2 - penetrazione e scapsidamento;
- 3 - trascrizione e traduzione degli RNA messaggeri virali;
- 4 - replicazione degli acidi nucleici virali;
- 5 - assemblaggio e fuoriuscita del virione maturo dalla cellula.

E' nella fase di sintesi dell'acido nucleico che i processi virali possono divergere significativamente da quelli cellulari dal momento che spesso entrano in azione enzimi virus-specifici.

Queste indagini consistono nella valutazione quantitativa di antigeni virali mediante saggi immunoenzimatici (ELISA) e in immunofluorescenza (IFA) e di genomi virali con tecniche di ibridazione degli acidi nucleici (Morganti, 1996) come la Reazione a Catena della Polimerasi Quantitativa (Q-PCR), la Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA), la Branched DNA Signal Amplification (bDNA) e il Sistema a Cattura di Ibrido (HCS) (tabella 1). L'individuazione del genotipo virale infettante e di mutanti farmaco-resistenti viene effettuata mediante sequenziamento o tramite particolari applicazioni delle tecniche di amplificazione genomica.

Virus	Materiale patologico	Indagini virologiche	
		Ricerca di antigeni	Ricerca di acidi nucleici
CMV	LSP*	IFA per p72**	Q-PCR, NASBA, bDNA, HCS
	LSP	IFA per pp65***	
	plasma		Q-PCR
HIV-1	plasma	ELISA per p24	Q-PCR, NASBA, bDNA
HCV	plasma		Q-PCR, bDNA

Per la ricerca di genotipi e mutanti resistenti ai farmaci si impiega il LiPA (Line Probe Assay).
 *LSP. Leucociti del sangue periferico. ** La ricerca della p72 viene effettuata dopo coltura rapida su fibroblasti in *shell vial*: viremia. ***La ricerca della pp65 viene effettuata direttamente negli LPS: antigenemia

Tabella 1. Indagini virologiche in grado di misurare la carica virale prima, durante e dopo una terapia con farmaci antivirali.

Infezione da HCV

Il farmaco attualmente in uso per la terapia delle epatiti croniche da HCV è l' α -interferone (α -IFN). La terapia "standard" con α -IFN (dose di 3MU somministrata 3 volte alla settimana per 6 mesi) non dà risultati completamente soddisfacenti dal momento che i *responders* rappresentano solo il 20% di tutti i pazienti trattati (Rumi et al, 1996). La tendenza attuale, che sembra produrre risultati incoraggianti (Saracco et al, 1996; Rossi et al, 1996) è quella di utilizzare trattamenti prolungati e dosi più elevate rispetto a quelle impiegate in passato. Tuttavia, in queste condizioni, i problemi di intolleranza riferibili a sintomatologia clinica, crisi ematica e reazioni immunogeniche possono avere incidenza elevata. Del tutto recentemente le possibilità terapeutiche delle epatiti croniche da HCV si sono allargate con l'introduzione, almeno in via sperimentale, di farmaci antivirali come la ribavirina, che associata all'IFN, sarebbe in grado di aumentare le risposte durature con riduzione delle ricadute frequentemente osservate alla sospensione dell'IFN stesso (French Multicenter Study Group, 1996).

Interferone

L'infezione delle cellule con la maggior parte dei virus a DNA e ad RNA induce la sintesi ed il rilascio di interferoni simili. Il componente chiave nell'induzione della sintesi è l'RNA a doppio filamento (dsRNA). La replicazione di un virus in una cellula comporta la sintesi di RNA virali, in forma di RNA genomico o messaggero; benché i dsRNA siano spesso solo un sottoprodotto della replicazione virale essi sono presenti in quantità più o meno abbondanti e sono quindi in grado di stimolare la produzione di IFN. L'IFN fa parte di una famiglia di glicoproteine ed è prodotto da diversi tipi di cellule in diverse condizioni.

In risposta all'infezione virale i linfociti sintetizzano principalmente α -IFN, mentre l'infezione di fibroblasti induce abitualmente la produzione di β -IFN. Esiste poi un terzo tipo di IFN detto γ -IFN che non viene indotto dall'infezione virale ma è sintetizzato dai linfociti in risposta a mitogeni. L'IFN non protegge la cellula dall'infezione virale direttamente ma, piuttosto, altera il metabolismo cellulare in vari modi, rendendo la cellula stessa un ospite meno adatto alla replicazione virale (stato antivirale). L'infezione virale, in cellule trattate con IFN, viene bloccata in vari stadi del

ciclo successivi all'adsorbimento ed alla penetrazione del virus. Vengono ridotti i livelli del genoma virale e della sintesi di mRNA e la traduzione viene anch'essa repressa. Sono stati configurati due meccanismi per tentare una spiegazione dello stato antivirale.

1°. L'IFN induce la sintesi di una proteina chinasi che, in presenza di dsRNA, fosforila il fattore d'inizio della sintesi proteica eIF-2 rendendolo inattivo.

2°. L'IFN induce anche la sintesi dell'enzima 2',5'-oligo A sintetasi; questo enzima attivato da dsRNA, prende parte ad una via metabolica che alla fine comporta l'attivazione di una ribonucleasi (RNasi L) e quindi la degradazione di RNA a singolo filamento.

Ribavirina

E' simile alla guanosina nella struttura (figura 1) e nella funzione

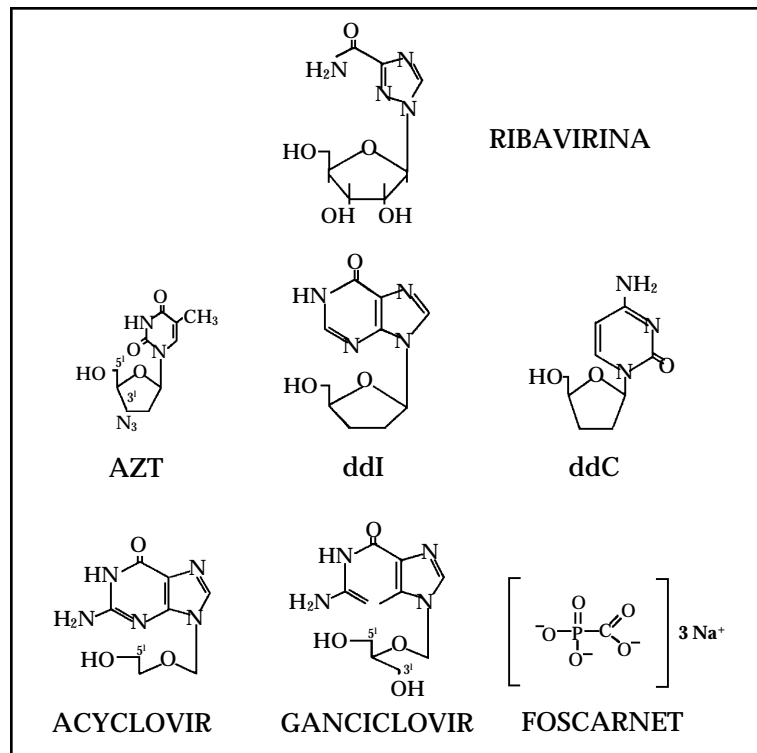


Figura 1. Alcuni farmaci antivirali.

(Streeter et al, 1973). E' attiva contro una grande varietà di virus a DNA e ad RNA. E' trasformata nelle cellule eucariotiche in mono-, di- e trifosfato (Streeter et al, 1973). La ribavirina-monofosfato è un potente inibitore della inosina-monofosfato deidrogenasi essenziale per la sintesi del nucleotide GTP (Streeter et al., 1973). Inoltre inibisce la formazione del *capping* dell'mRNA virale (Goswami et al, 1979) che rappresenta una fase critica nella replicazione della maggior parte dei virus. Come trifosfato è in grado di inibire anche la RNA polimerasi dei virus influenzali (Eriksson et al, 1977). Somministrata da sola, la ribavirina si è dimostrata efficace nel ridurre i livelli di Alanina Transaminasi (ALT) nei pazienti con infezione cronica da HCV paradossalmente senza modificare i livelli sierici di HCV-RNA. Tutti i pazienti trattati sono andati incontro a recidiva dopo sospensione del trattamento (Reichard et al, 1991; Di Bisceglie et al, 1992). Studi successivi di piccole dimensioni, in cui è stata impiegata la ribavirina in associazione con IFN, hanno dimostrato un significativo effetto sinergico dei due farmaci che si esplica soprattutto nel recupero di pazienti andati incontro a *relapse* dopo il primo ciclo di IFN da solo (Kakumu et al, 1993; Brillanti et al, 1994).

Fattori che influenzano la risposta alla terapia

La risposta alla terapia con IFN è dipendente da alcuni fattori legati alle caratteristiche dell'ospite e della terapia stessa, ma anche ai livelli di viremia e al genotipo del virus* (Tsubota et al, 1994; Pagliaro et al, 1994).

Elevati livelli di viremia influenzano in modo negativo la risposta all'IFN, mentre livelli basali di viremia inferiori a $3,5 \times 10^5$ genomi equivalenti per ml di siero o plasma sono associati in modo statisticamente significativo** a risposte più durature (Lau et al, 1993).

*Il confronto delle sequenze di numerosi isolati di HCV ha permesso di dimostrare l'esistenza di gruppi di virus definiti genotipi che presentano un livello di divergenza tra sequenze genomiche pari al 35%; sono stati identificati almeno sei genotipi (1-6) che si suddividono in sottotipi (a, b, c). In Italia prevalgono i genotipi 1b e 2c.

**Una diminuzione della carica virale almeno di $1 \log_{10}$ entro una settimana dall'inizio del trattamento sembra rappresentare un fattore prognostico favorevole.

Il genotipo 1 (1a, 1b), maggiormente rappresentato in Italia (75%), manifesta una scarsa propensione alla risposta duratura all'IFN. Percentuali di risposta sensibilmente più elevate si ottengono nei soggetti infettati con i genotipi 2a, 2b, 3 (Martinot-Peignoux et al, 1995). Per il genotipo 2c, molto prevalente in Italia (Pistello et al, 1994; Cammarota et al., 1995) non esistono ancora informazioni consolidate.

Dosaggio sierico di HCV-RNA

Il dosaggio sierico di HCV-RNA è quindi indispensabile per consentire un intervento terapeutico più mirato in quei soggetti che hanno maggiori possibilità di risposta alla terapia con IFN da solo o in associazione ad antivirali come la ribavirina e per accertare una guarigione definitiva*.

La valutazione della carica virale di HCV nel siero o in altri materiali patologici può essere effettuata con PCR quantitativa o con bDNA. Per la determinazione del genotipo e del sottotipo si ricorre al sequenziamento o a tecniche alternative quali la RT-PCR seguita da digestione enzimatica dell'amplificato (RFLP) o da ibridazione con sonde tipo e sottotipo specifiche adese su micropiastra (DEIA) o su nitrocellulosa (LiPA) e la RT-PCR con primers tipo e sottotipo specifici.

*In un recente studio italiano (Chemello et al, 1996) il 100% dei pazienti HCV-RNA negativi al termine del trattamento e dodici mesi dopo, sono risultati guariti da epatite C in controlli sequenziali condotti lungo un arco di quattro anni (*responders*). Al contrario il 50% dei pazienti che rimanevano HCV-RNA positivi, aveva avuto una ripresa dell'epatite durante i quattro anni di follow-up (*non-responders*).

Infezione da HIV-1

L'eradicazione di HIV-1 rimane un obiettivo primario ma a tutt'oggi non raggiunto. Negli ultimi anni sono stati compiuti importanti progressi nella conoscenza della patogenesi della malattia da HIV-1 (Pantaleo et al, 1993), nello sviluppo di tecniche virologiche utili per il monitoraggio della replicazione virale (Ho et al, 1995) e nell'introduzione nella terapia antiretrovirale di nuovi farmaci quali gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi e gli inibitori della proteasi. Alcuni di questi farmaci sono già entrati nella pratica clinica, altri saranno registrati anche in Italia nei prossimi mesi, altri ancora sono in avanzata fase di sperimentazione.

Inibitori della trascrittasi inversa (RTI)

La trascrittasi inversa (RT) svolge un ruolo fondamentale nel ciclo di replicazione di HIV-1 in quanto catalizza la trascrizione da RNA a DNA che, attraverso una integrasi virale, si inserisce nel genoma della cellula ospite (DNA provirale).

a) Analoghi dei substrati (nucleosidici)

Vengono anche detti inibitori dell'RT analoghi dei nucleosidi (NRTI) o analoghi 2',3'-didesossinucleosidici e sono caratterizzati dalla sostituzione del radicale -OH in posizione 3 dell'anello saccaridico di desossinucleosidi pirimidinici o purinici con azoto, idrogeno o fluoro. I più noti della serie sono la zidovudina (AZT), la didanosina (ddI), la zalcitabina (ddC) (figura 1), la stavudina (D4T) e la lamivudina (3TC). L'attività dell'AZT e degli altri quattro agenti prevede la preliminare fosforilazione nella forma trifosfato ad opera di chinasi cellulari (Furman et al, 1986). Tale fosforilazione si realizza più efficacemente nelle cellule infettate che non in quelle normali.

Schematicamente sembrano esistere due meccanismi attraverso i quali l'AZT e gli altri composti possono interagire con il bersaglio:

1 - inibizione dell'RT attraverso un processo di competizione rispetto al substrato naturale; l'AZT compete infatti con il dTTP legandosi alla RT molto più efficacemente del suo naturale competitore e costituendo perciò il substrato preferito (Furman et al, 1986; St. Clair et al, 1987). L'inibizione dell'RT avviene ad una concentrazione pari a 1/100 rispetto a quella necessaria per inibire la DNA polimerasi cellulare (Furman et al, 1986);

2 - interruzioni della catena di DNA dopo incorporazione all'estremità 3' (Furman et al, 1986; St. Clair et al, 1987; Yarchoan et al, 1989); ad es. nell'AZT il posto dell'idrossile in posizione 3 dell'anello saccaridico è occupato da un azido-gruppo (N₃) che perciò impedisce il legame a qualsiasi altro nucleotide.

b) Analoghi non nucleosidici

Gli inibitori dell'RT analoghi non nucleosidici (NNRTI) non interagiscono con i siti leganti il substrato della DNA polimerasi, sia RNA dipendente o DNA dipendente, e perciò è da ritenere che siano meno tossici degli NRTI (De Clercq 1992, 1993). Quelli maggiormente impiegati, tra cui la nevirapina e la delavirdina, sono rappresentati in figura 2.

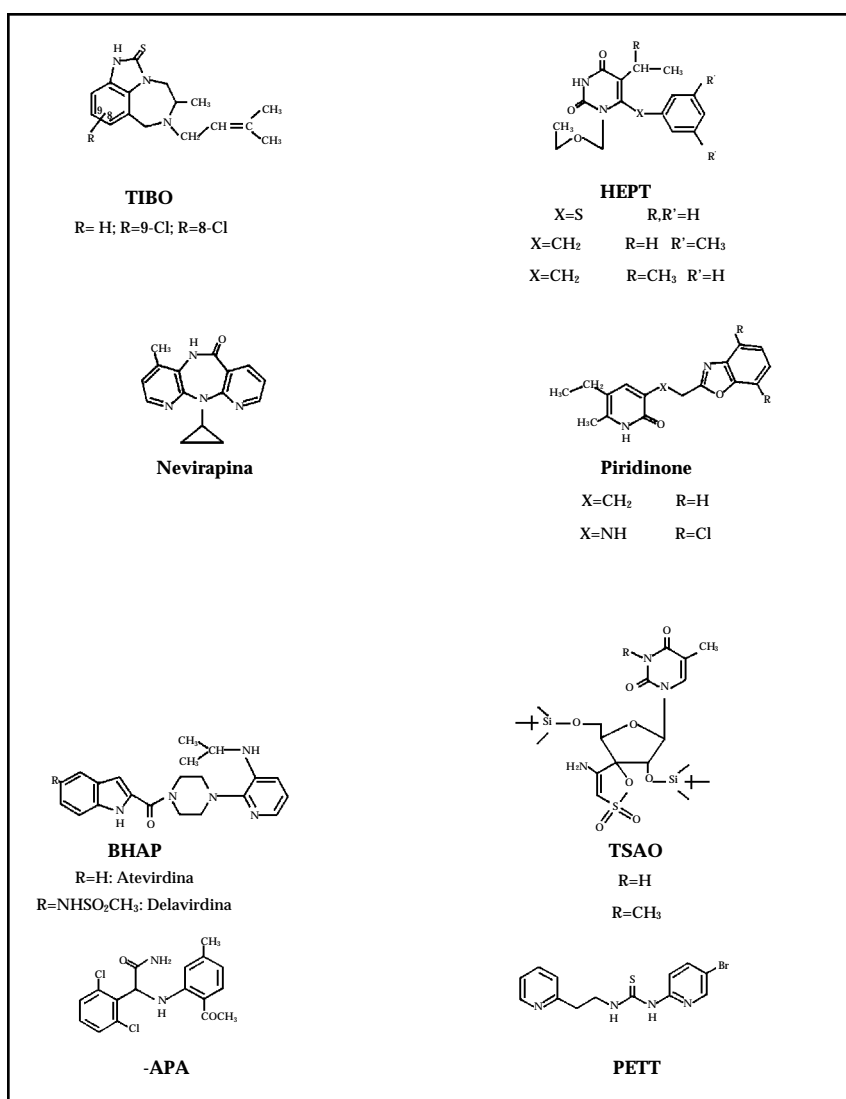


Figura 2. Alcuni Inibitori Non Nucleosidici della Transcriptasi Inversa di HIV-1 (NNRTI).

Inibiscono la trascrizione dell'RNA a DNA ad opera dell'RT ma in modo non competitivo rispetto al substrato e al complesso stampo-primer (De Clercq, 1995). Interagendo con un sito dell'enzima diverso dal sito di legame del substrato alterano la conformazione della molecola enzimatica in modo tale da provocare un'inattivazione reversibile del sito catalitico.

Inibitori della proteasi

Gli inibitori dell'RT possono prevenire la formazione di nuove molecole di DNA provirale in cellule non ancora infettate da HIV-1 ma non possono prevenire la riattivazione del virus nelle cellule già infettate dal momento che l'RT non è coinvolta in questo processo. I prodotti dei geni *gag* e *pol*, tra cui la RT, sono sintetizzati come polipeptidi precursori. Queste molecole vengono poi tagliate e processate prima di essere impaccate nel virione maturo. La proteasi di HIV-1, un'aspartico proteinasi codificata dal gene *pol*, è responsabile di questi processi ed è essenziale quindi per l'assemblaggio e la maturazione dei virioni.

Sono stati identificati in questi ultimi tempi agenti capaci di prevenire la riattivazione del virus poichè interferiscono con fasi avanzate del ciclo di replicazione di HIV-1. Alcuni di questi agenti costituiscono un gruppo detto degli inibitori della proteasi (PI) (figura 3). Si tratta di composti peptidomimetici dello stato di transizione della reazione enzimatica che, sostituendosi al naturale substrato, determinano la formazione di uno stato di transizione non più idrolizzabile (De Clercq, 1991). I più impiegati sono il saquinavir, il ritonavir, l'indinavir, il nelfinavir (figura 3) ed il VX-478.

Resistenza del virus ai farmaci

In assenza di pressione selettiva da farmaco una popolazione di virus è caratterizzata da molte varianti genetiche che costituiscono la quasispecie virale (per es. in un soggetto infettato da HIV-1 si calcola vi siano circa 1000 sottopopolazioni di varianti del virus). La presenza di un agente antivirale altera la pressione selettiva e molte varianti "preesistenti" conseguono un vantaggio rispetto ai loro competitori *wild-type*. Con l'andar del tempo si selezionano quindi varianti virali resistenti il cui numero tende ad aumentare rispetto a quello dei *wild-type* determinando così la formazione di una popolazione predominante di virus resistenti (Richman, 1996).

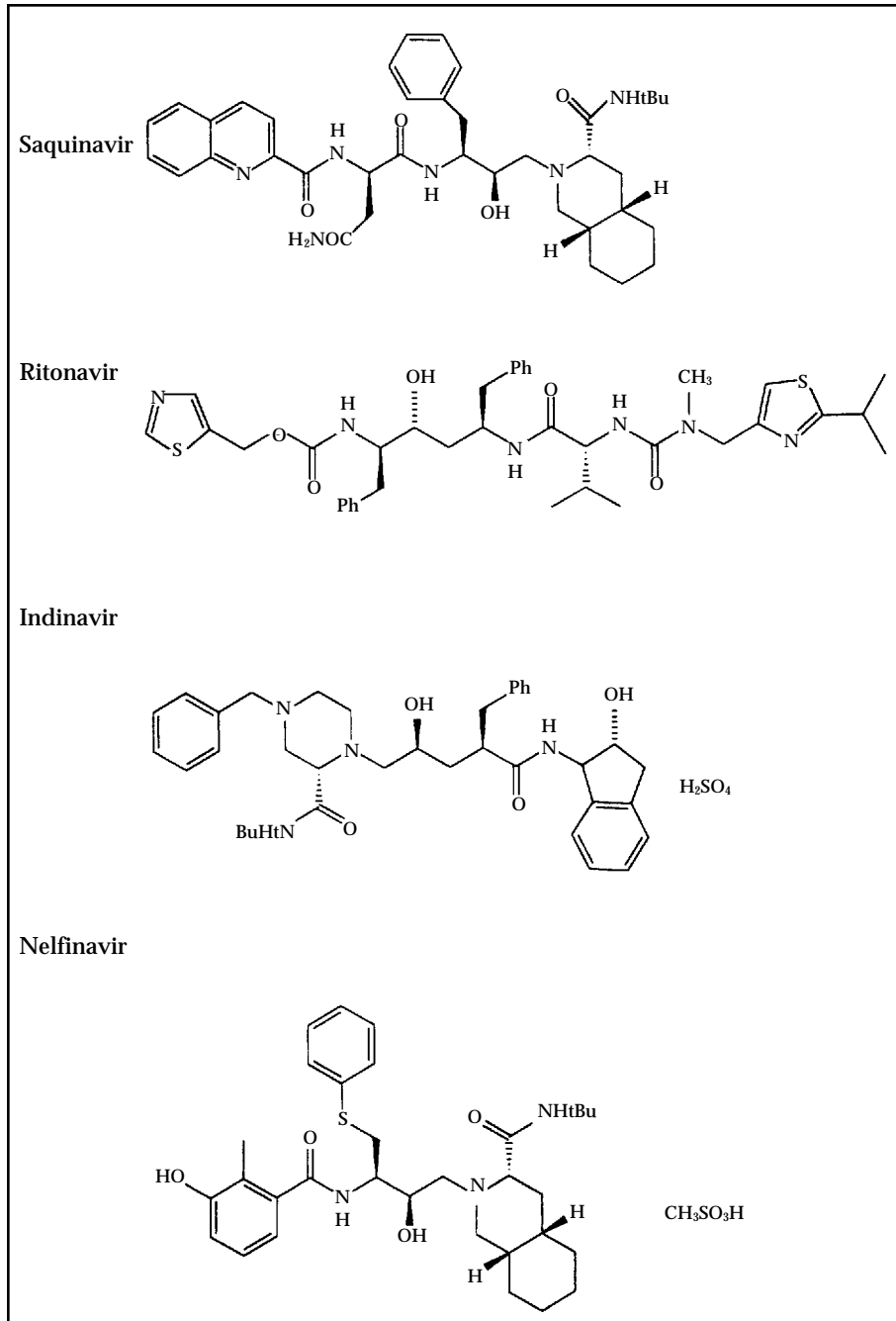


Figura 3. Inibitori della Proteasi di HIV-1 (PI).

Le mutazioni che conferiscono resistenza avvengono frequentemente durante l'infezione (poiché l'RT non è in grado di controllare il corretto appaiamento delle basi durante la trascrizione dell'RNA in DNA) e indipendentemente dalla presenza dell'agente antivirale (tabella 2).

La prevalenza di una mutazione che conferisce resistenza dipende da:

- velocità di mutazione;
- velocità di turnover virale;
- *fitness* dei virus con quella mutazione.

Ci sono 11 nuovi agenti antiretrovirali approvati in USA per il trattamento delle infezioni da HIV-1 e sono state isolate le varianti di HIV-1 resistenti a ciascuno di essi. Il significato clinico di molte di queste varianti non è completamente chiarito, ma la resistenza agli agenti antivirali è considerata la prima causa del fallimento della terapia nelle infezioni da HIV-1.

Alta velocità di replicazione virale
Alta velocità di mutazione
Alto turnover cellulare
Terapia con incompleta soppressione della replicazione virale (es. monoterapia)

Tabella 2. Fattori associati a rapida comparsa di resistenza virale ai farmaci.

Le più importanti mutazioni associate a resistenza verso i maggiori composti antiretrovirali già in uso clinico e in corso di sviluppo sono riportate nella tabella 3. Esistono anche mutazioni che sopprimono l'effetto di altre: per es., la mutazione 184V, che determina resistenza alla lamivudina, sopprime l'effetto delle due mutazioni M41L e T215Y che conferiscono resistenza alla zidovudina.

Resistenza fenotipica e genotipica

A livello fenotipico la sensibilità degli isolati virali ai vari agenti si determina con l'uso di colture cellulari in cui viene fatto crescere il virus (fenotipizzazione) e si esprime come IC_{50} che è la concentrazione di farmaco (espressa in $\mu\text{g}/\text{ml}$ o μM) necessaria a inibire del 50% la crescita del virus.

Se la IC_{50} aumenta di 5-8 volte allora siamo in presenza di resistenza fenotipica (RF). L'individuazione della resistenza genotipica si effettua invece accertando la presenza di mutazioni che sappiano conferire RF e si determina mediante sequenziamento dei tratti di genoma virale coinvolti oppure, più semplicemente, caratterizzando amplificati delle stesse regioni con sonde fissate a idonei supporti (LiPA, vedi sotto).

Agente	Classe	Sostituzione di aminoacido associata a resistenza
Zidovudina	NRTI	M41L, D67N, K70R, T215Y/F
Didanosina	NRTI	K65R, L74V, V75T, M184V
Zalcitabina	NRTI	K65R, L74V, T69D, V75T, M184V
Stavudina	NRTI	V75T
Lamivudina	NRTI	M184V/I/T
1592	NRTI	K65R, L74V, M184V
Nevirapina	NNRTI	K103N, V106A, V108I
Delavirdina	NNRTI	K103N/T, Y181C, P236L
NMP-266	NNRTI	L100I, V179D, Y181C
Ritonavir	PI	V82A/F/S/T
Indinavir	PI	M461/L, V82A/F/T
Saquinavir	PI	G48V, L90M
Nelfinavir	PI	D30N
141	PI	M46I, I47V, I50V

Tabella 3. Mutazioni puntiformi nel genoma di HIV-1 associate a resistenza contro i più importanti agenti antiretrovirali (Schinazi et al, 1997). NRTI = Inibitori Nucleosidici della RT; NNRTI = Inibitori Non Nucleosidici della RT; PI = Inibitori della Proteasi. A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; Y, Tyr. L'aminoacido (aa) a sinistra è nel wild-type, quello a destra è nel mutante, mentre il numero interposto indica la posizione nella catena aminoacidica.

Combinazione di terapie

La combinazione di terapie determina una diminuita tossicità a causa della riduzione nel dosaggio dei singoli composti, un ridotto rischio di

sviluppo della resistenza del virus al farmaco se risultante da mutazioni diverse nel genoma virale, una sinergica attività antivirale se l'azione anti HIV-1 ha come bersaglio differenti proteine virali o siti differenti di una stessa proteina (De Clercq, 1995).

La terapia d'esordio va di norma praticata con combinazioni di 2 NRTI + 1 PI. Queste associazioni permettono di ottenere la riduzione della carica virale sotto la soglia misurabile in circa il 40% dei pazienti. L'associazione di 2 NRTI + 1 NNRTI o di 2 NRTI + 2 PI è ancora in fase sperimentale.

Le ultime linee guida di terapia antiretrovirale (Ho et al, 1995; Aiuti et al, 1995; Carpenter et al., 1995; BHIVA, 1997; Carpenter et al., 1997) conferiscono particolare valore predittivo alla determinazione della viremia plasmatica (HIV-1-RNA), dato che la concentrazione plasmatica di HIV-1-RNA è considerata il miglior marker della progressione della malattia e che la prognosi nell'infezione da HIV-1 è direttamente correlata al livello di viremia. Una riduzione della viremia in risposta alla terapia dovrebbe quindi migliorare la prognosi; si considerano significative, ai fini della condotta terapeutica, variazioni della concentrazione plasmatica di HIV-1-RNA superiori o uguali a $0.5 \log_{10}$ (Saag et al, 1996).

Dosaggio plasmatico di HIV-1-RNA

I metodi di laboratorio più largamente in uso per determinare la concentrazione plasmatica (in copie/ml) di HIV-1-RNA sono attualmente la PCR quantitativa, la NASBA e la tecnica del bDNA.

Infezione da CMV

I farmaci impiegati nella cura delle patologie sostenute da CMV, che colpiscono prevalentemente pazienti immunocompromessi come malati di AIDS o soggetti sottoposti a trapianto d'organo o di midollo, sono principalmente tre: l'acyclovir, il ganciclovir e il foscarnet.

Acyclovir

L'acyclovir (figura 1) ha il miglior indice terapeutico tra gli agenti antivirali disponibili ed è largamente usato per il trattamento delle infezioni erpetiche. E' un analogo della guanosina ma al posto di un anello completo di ribosio (legato alla base purinica), possiede una parte aciclica.

L'acyclovir diffonde liberamente nelle cellule, ma agisce solo nelle cellule infettate dai virus erpeticici perché la prima fase di attivazione, la fosforilazione in posizione 5' della molecola (parte aciclica), è catalizzata da una timidina chinasi virale (Elion et al, 1977). Le fosforilazioni successive a di- e trifosfato sono catalizzate da enzimi cellulari (Elion et al., 1977). Durante la replicazione del DNA l'acyclovir trifosfato compete con il substrato naturale (il dGTP) per il legame alla DNA polimerasi virale ed avendo una maggiore affinità per l'enzima rispetto al dGTP, è perciò incorporato preferenzialmente nella catena nascente di DNA virale (Elion et al., 1977). Dato che nella molecola di acyclovir inserita nella catena nascente di DNA manca l'idrossile in posizione 3', il successivo nucleotide non può essere incorporato e la replicazione del DNA ha termine (Derse et al. 1981). Inoltre, quando l'acyclovir si lega allo stampo di DNA in presenza del successivo nucleotide, si forma un complesso irreversibile e la polimerasi viene completamente inattivata (Derse et al., 1981).

Nel loro insieme queste proprietà rendono l'acyclovir altamente selettivo nella inibizione della replicazione virale mentre l'effetto sulle funzioni della cellula ospite è modesto; infatti, la concentrazione di acyclovir necessaria per inibire il virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) è 3000 volte inferiore a quella necessaria per inibire le cellule in cui HSV-1 cresce.

Ganciclovir

E' un analogo dei nucleosidi identico all'acyclovir tranne per la presenza di un gruppo idrossile in posizione 3' (figura 1). E' attivo contro tutti i virus

herpeticici (Field et al., 1983) ed è oltre 100 volte più efficace dell'acyclovir nei confronti del CMV (Tocci et al., 1984). E' tuttavia più tossico dell'acyclovir e per questa ragione è stato soprattutto impiegato nel trattamento di malattie da CMV in pazienti immunocompromessi. Il ganciclovir non è un terminatore di catena come l'acyclovir in quanto possiede un idrossile in posizione 3', tuttavia è un potente inibitore della polimerasi virale (e cellulare).

Foscarnet

Il foscarnet o fosfonofornato sodico (figura 1) è un analogo dei pirofosfati che, come altri agenti antivirali attualmente in uso, non necessita di attivazione da parte di chinasi virali o cellulari. La molecola si lega direttamente ai siti leganti il pirofosfato della RNA e DNA polimerasi inibendo i due enzimi in modo non competitivo rispetto ai substrati nucleotidici (Bean, 1992). Si pensa che il foscarnet, legato alla polimerasi, formi un intermedio instabile con i monofosfati nucleosidici determinando una degradazione degli acidi nucleici (Oberg, 1989). Il foscarnet agisce sia sulle polimerasi virali che su quelle cellulari ma, rispetto alle concentrazioni necessarie per inibire gli enzimi cellulari, quelli virali sono inibiti da concentrazioni notevolmente inferiori (da 1/10 a 1/2).

Nei pazienti con retinite da CMV il foscarnet e il ganciclovir sembrano essere egualmente attivi nel prevenire la progressione della malattia. Il potenziale vantaggio del foscarnet, rispetto al ganciclovir, in questo settore terapeutico è dovuto alla sua minore tossicità per il midollo osseo e al suo possibile uso in combinazione con la zidovudina. Il foscarnet è anche molto utile nel trattamento dei pazienti affetti da AIDS con infezioni da HSV o VZV (virus della varicella zoster) che sviluppano resistenza all'acyclovir.

Misura della carica virale

Le indagini di laboratorio più importanti in grado di misurare la carica del CMV prima durante e dopo la terapia si dividono in due gruppi:

1° - ricerca della proteina virale precoce **pp65** direttamente negli LSP del paziente (antigenemia) oppure di quella immediatamente precoce **p72** dopo loro coltura rapida (24 ore) su fibroblasti diploidi in *shell vial* (viremia);

2° - ricerca del DNA virale nel sangue o in sue frazioni attraverso PCR quantitativa, bDNAe HCS e dell'mRNA della pp65 mediante NASBA.

Ricerca di antigeni virali

Gli antigeni (Ag) virali più comunemente ricercati per monitorare l'efficacia di terapie antivirali sono la **pp65** e la **p72** di CMV e la **p24** di HIV-1.

Citomegalovirus

La replicazione del CMV è regolata nel tempo. Il periodo immediatamente precoce (IE: 2-4 ore dopo l'infezione) è caratterizzato dalla sintesi della maggiore proteina IE, la fosfoproteina p72, oltre che da proteine, meno abbondanti, ma essenziali per l'ulteriore trascrizione genomica. La fase precoce (E) precede la replicazione del DNA virale e si estende per circa 24 ore. Vari prodotti dei geni E sono enzimi coinvolti nella replicazione del DNA virale. La più abbondante proteina strutturale del virione, la fosfoproteina pp65, è anch'essa sintetizzata in questa fase, sebbene la sua maggior sintesi avvenga nel periodo tardivo (L). La fase L inizia 36-48 ore dopo l'infezione; in questo periodo vengono prodotte proteine strutturali e vengono assemblati e poi rilasciati virioni maturi.

Antigenemia da CMV

Usualmente la valutazione della pp65 si esegue su 2×10^5 LSP. Nel protocollo standard si effettua fissando le cellule con formalina al 5%, permeabilizzando quindi il preparato con Nonidet P-40 all'1%, saggiando quindi gli LSP con un pool di anticorpi (Ab) monoclonali anti pp65 (diretti contro vari epitopi della proteina) marcati con isotiocianato di fluoresceina (FITC) e infine contando i nuclei fluorescenti al microscopio (Gerna et al, 1992). I risultati sono espressi come numero di LSP pp65 positivi su 2×10^5 LSP esaminati (Gerna et al, 1994).

Viremia (o Saggio con shell vial) da CMV

Si effettua inoculando 2×10^5 LSP in una coltura di fibroblasti in *shell vial* (piccolo recipiente contenente un vetrino coprioggetti con adesi fibroblasti diploidi di polmone di embrione umano), centrifugando a bassa velocità per facilitare l'infezione delle cellule diploidi e incubando a 37°C per 16-24 ore (coltura rapida) (Gerna et al, 1990). Successivamente si procede alla fissazione delle cellule con metanolo-acetone (1:2), alla colorazione dei nuclei dei fibroblasti con un pool di Ab monoclonali anti-p72 (diretti contro vari epitopi della proteina) marcati con FITC e alla conta dei nuclei fluorescenti al

microscopio (figura 4). Sulla base dell'osservazione che ogni LSP è capace di produrre l'infezione di un singolo fibroblasto, i risultati vengono espressi come numero di nuclei di fibroblasti p72 positivi su 2×10^5 LSP esaminati (Gerna et al, 1994).

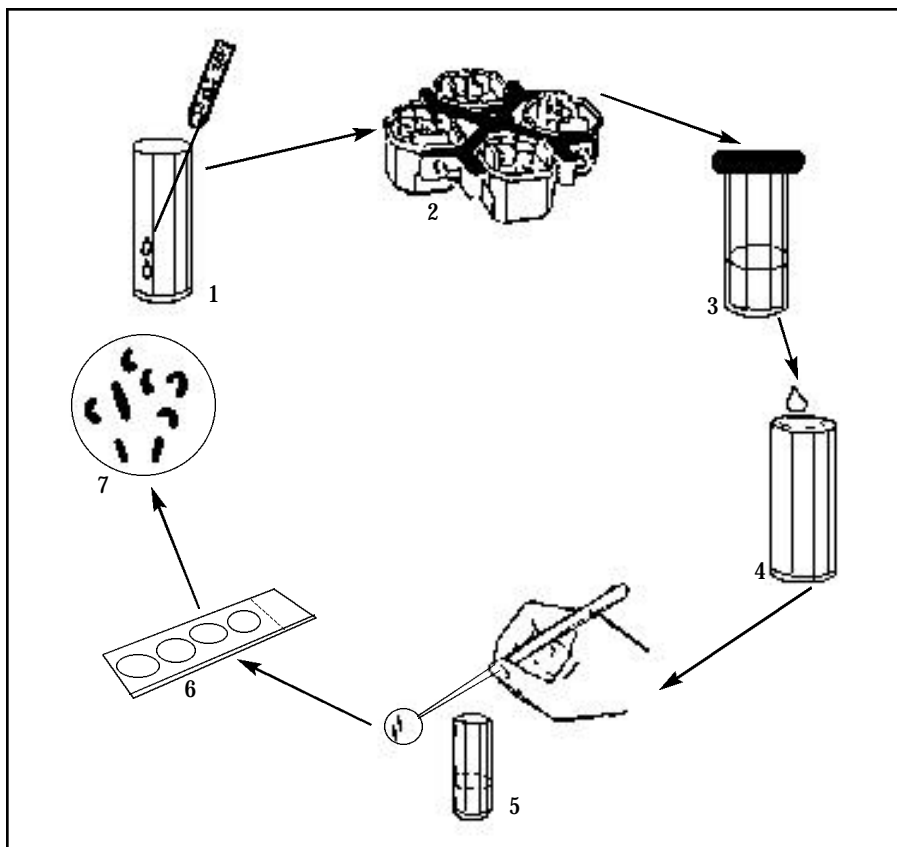


Figura 4. Rappresentazione schematica del saggio con shell vial:
 1) il campione è seminato direttamente all'interno di una provetta su un monostrato di cellule posto sulla superficie di un vetrino;
 2) la provetta è centrifugata a bassa velocità;
 3) e incubata per 24 ore a 37° C;
 4) il vetrino viene colorato all'interno della provetta mediante Ab monoclonali anti-CMV marcati;
 5, 6) viene rimosso dalla provetta e montato per l'osservazione al microscopio;
 7) inclusioni fluorescenti che dimostrano la presenza del CMV nel campione.

Il saggio per la misura dell'antigenemia da CMV è più rapido e sensibile rispetto alla coltura rapida (viremia) ed è quindi più idoneo al monitoraggio dell'efficacia delle terapie anti-CMV (Revello et al, 1994).

L'antigenemia da CMV può essere misurata anche con l'uso della citometria a flusso (Imbert-Marcille et al, 1997) impiegando Ab monoclonali anti-CMV marcati con FITC ed esprimendo i risultati come percentuale degli LSP positivi.

Virus dell'immunodeficienza umana

La misura dell'antigenemia da HIV-1 è rappresentata dalla determinazione dei livelli plasmatici della p24 che è la proteina più abbondante del nucleocapside. Questo dosaggio si effettua, dopo denaturazione al calore o dissociazione acida degli immunocomplessi plasmatici che legano la p24, con un test ELISA su micropiastra che fa uso di Ab anti-p24 legati alla fase solida (Schupbach et al, 1996). I livelli di p24 sono ottenuti utilizzando una curva standard ed i risultati sono espressi in pg/ml. Il limite di sensibilità del saggio è intorno a 0,5 pg/ml.

PCR quantitativa

La Reazione Polimerasica a Catena (Polymerase Chain Reaction, PCR) è una tecnica che permette di ottenere quantità rilevanti di un determinato tratto di DNA (o RNA dopo che questo è stato convertito in cDNA da una RT). Dalla sua introduzione, dovuta nel 1984 ad una geniale intuizione del Dr. Kary Mullis della Cetus Corporation, la PCR ha trovato applicazione in numerosissimi settori della biomedicina primo tra tutti quello della diagnostica microbiologica perché consente di individuare e quantificare in modo rapido agenti patogeni presenti in piccolissime quantità (Pershing et al, 1993).

La reazione sfrutta l'azione di una DNA polimerasi termostabile per duplicare uno specifico frammento di DNA delimitato alle sue estremità da due primer oligonucleotidici specifici che ibridizzano con una specifica sequenza complementare di DNA. Agli oligonucleotidi si attacca la DNA polimerasi che, incorporando nucleotidi trifosfati presenti nella miscela di reazione, sintetizza il tratto di DNA compreso tra i due primer. Ogni ciclo di amplificazione avviene in tre stadi ed a tre diverse temperature:

- 1) denaturazione del DNA a doppia catena (a temperature superiori a 90°C);
- 2) ibridizzazione dei primer alla sequenza complementare del DNA (la temperatura, di solito compresa tra 42 e 70°C, dipende dalla sequenza e dalla lunghezza dei primer);
- 3) sintesi di un nuovo filamento di DNA (a temperature comprese tra 68 e 72°C, dipendente dalla polimerasi utilizzata).

I filamenti neoformati sono complementari al filamento stampo e, poiché il processo di estensione avviene su entrambi i filamenti, al termine di ogni ciclo il numero di frammenti di DNA sarà doppio rispetto a quello iniziale. Sfruttando la resistenza all'inattivazione termica propria delle DNA polimerasi termostabili è possibile quindi sottoporre il campione a cicli termici successivi (generalmente 25-50) ottenendo l'amplificazione esponenziale del tratto di DNA compreso tra i due primer. In realtà il numero finale di molecole di amplificato dipenderà dall'efficienza con cui è avvenuta la PCR, secondo la seguente formula: $f=i(1+e)^n$, dove f ed i sono, rispettivamente, la concentrazione finale ed iniziale del DNA bersaglio; e è il fattore di efficienza (compreso tra 0 e 1) ed n è il numero di cicli.

Negli ultimi anni sono stati compiuti notevoli sforzi per automatizzare e standardizzare al massimo la reazione migliorandone quindi le potenzialità diagnostiche. Oggi sono disponibili in commercio numerosi apparecchi (termociclatori) il cui utilizzo consente di effettuare più reazioni contemporaneamente, in condizioni di temperatura ben controllate e con livelli di efficienza prossimi al 100%; sono stati introdotti, inoltre, nuovi sistemi sensibili e specifici per la rivelazione degli amplificati che permettono la quantificazione dei prodotti di PCR.

Il principio su cui si basa la PCR di tipo quantitativo è che la quantità di prodotto finale è proporzionale alla quantità di DNA bersaglio iniziale. In teoria sarebbe quindi possibile determinare il numero di copie di DNA bersaglio di un campione mediante la comparazione del relativo prodotto di PCR con quelli ottenuti da campioni standard a numero di copie noto. In realtà questo sistema porta a grossolani errori di quantificazione perché la quantità di prodotto di amplificazione che si accumula è funzione dell'efficienza di amplificazione, che è diversa per ogni campione. I parametri che influenzano l'efficienza di amplificazione sono: qualità del DNA stampo, concentrazione di nucleotidi trifosfati, primer ed enzima, composizione del tampone di reazione e termocicizzatore (Clementi et al, 1993). Per ovviare a questo problema sono stati messi a punto metodi di amplificazione che prevedono la co-amplificazione di standard interni simili, ma non identici per sequenza o lunghezza, al tratto di acido nucleico del campione da amplificare.

Questi standard sono chiamati anche competitori poiché, alle proprie estremità, portano sequenze riconosciute dai primer che quindi potranno legarsi sia al competitore, sia al DNA bersaglio del campione (PCR competitiva). Durante la reazione di amplificazione i due frammenti di DNA vengono coamplificati allo stesso tempo e con la stessa efficienza ed è quindi possibile, misurando la quantità dei relativi prodotti di amplificazione e conoscendo il numero di molecole di competitore, calcolare esattamente il numero di copie del DNA bersaglio nel campione in esame (Clementi et al, 1993). Operativamente, la PCR competitiva viene di solito allestita in più provette contenenti una quantità fissa di campione e diluizioni scalari a concentrazione nota di standard. Al termine della reazione i campioni vengono corsi su gel di agarosio o acrilamide e le densità ottiche (OD) dei relativi prodotti di amplificazione vengono misurate con un densitometro ottico. Le OD dello standard e del campione vengono poi riportate su un grafico (OD su N° di copie) ottenendo così due curve, una per lo standard ed una per il campione. L'intersezione tra le due curve rappresenta il punto di equivalenza tra numero di copie dello standard e del campione. La figura 5 riporta un esempio di PCR competitiva con la quale è stato determinato il numero di copie di DNA provirale di un virus simile ad HIV-1 nel DNA genomico estratto dal sistema nervoso centrale (CNS) di un animale infetto. La reazione è stata allestita in sei provette, in ciascuna delle quali è stato aggiunto 1 µg di DNA genomico ed una quantità nota di competitore compresa tra 16×10^3 e $0,5 \times 10^3$ molecole. Nel grafico sono riportati i valori di OD ottenuti dai relativi prodotti di amplificazione del competitore (117 paia di basi, indicato come D nel gel e D117 nel grafico) e del campione (138 paia di basi, indicato come C nel gel e CNS nel grafico). La freccia indica il punto di equivalenza tra le due curve che corrisponde a $4,3 \times 10^3$ copie della sequenza bersaglio per µg di DNA cellulare (Pistello et al, 1994).

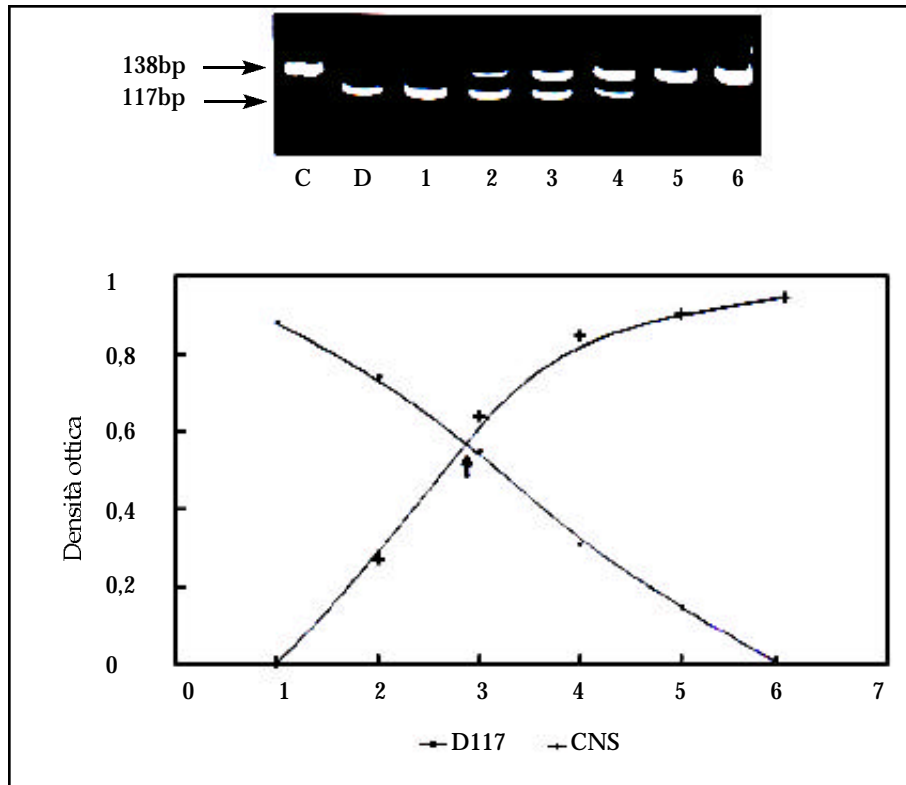


Figura 5. Esempio di PCR competitiva.

Nonostante sia in grado di fornire dati quantitativi molto precisi, questa tecnica è poco adatta ad un uso routinario o per numeri elevati di campioni, perché piuttosto costosa (per ogni campione bisogna effettuare parecchie amplificazioni in parallelo) e indaginosa (i prodotti di amplificazione, potenti sorgenti di contaminazione, devono essere corsi su gel e letti con un densitometro ottico). Per ovviare a questi svantaggi, la maggior parte dei sistemi diagnostici oggi in commercio prevede l'aggiunta di uno o più standard interni come controlli di amplificazione con i quali è possibile verificare l'efficienza di amplificazione e normalizzarla rispetto a standard esterni (Revetts et al, 1996). In questo modo è possibile costruire una curva di taratura esterna con la quale quantificare vari campioni. La rilevazione dei prodotti amplificati avviene inoltre con l'ausilio di primers biotinilati, incorporati durante l'amplificazione e che permettono di fissare i prodotti di amplificazione sul fondo di pozzetti di micropiastre. Il dosaggio del DNA avviene poi tramite avidina coniugata con perossidasi e successivo saggio enzimatico (figura 6). Infine, nei kit commerciali di ultima generazione per

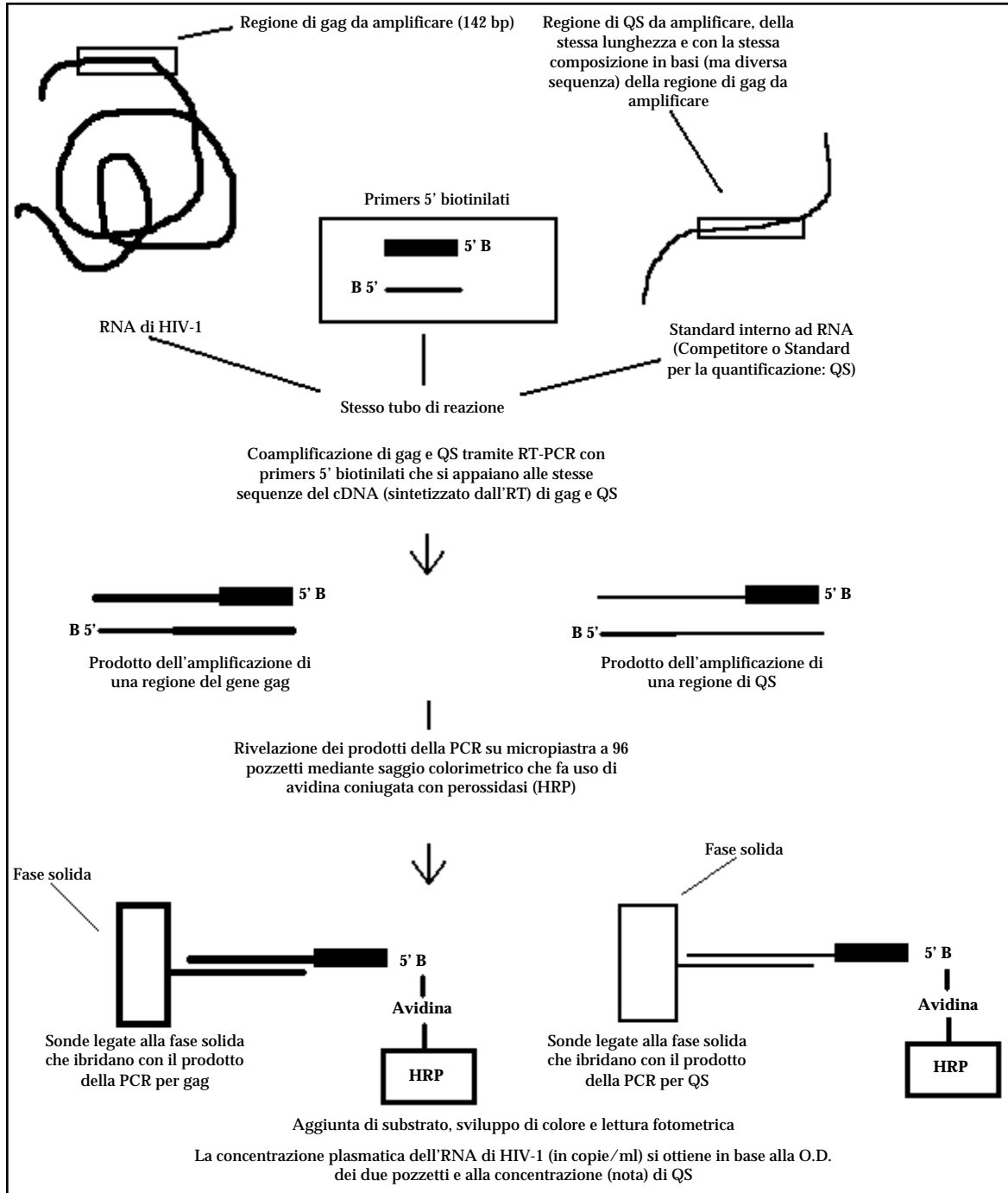


Figura 6. Rappresentazione schematica di una QC-PCR (PCR Quantitativa e Competitiva) in cui campione e standard vengono coamplificati (Mulder et al, 1994).

misurare la viremia plasmatica di HIV-1 ed HCV sono stati introdotti sistemi di prevenzione della contaminazione da *carry-over*, dovuto principalmente a prodotti di amplificazione presenti nell'ambiente.

E' prevista inoltre l'aggiunta dei controlli interni di amplificazione prima dell'estrazione dell'acido nucleico dal campione.

Mediante la normalizzazione dei prodotti di amplificazione è possibile quindi quantificare la sequenza bersaglio compensando la perdita di acido nucleico avvenuta durante la fase di estrazione.

Data l'importanza che la valutazione quantitativa della carica virale riveste per il *management* dei pazienti, le ditte produttrici di sistemi di amplificazione degli acidi nucleici hanno cercato di fornire kit sempre più maneggevoli e accessibili anche ai laboratori privi di una particolare *expertise* nelle tecniche di biologia molecolare.

La ricerca nel campo della biotecnologia ha oggi permesso la distribuzione commerciale di sistemi automatizzati sia per la fase di estrazione degli acidi nucleici che per la fase di amplificazione e analisi dei risultati.

NASBA

La Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA), descritta da Compton (1991) ed applicata alla diagnostica virologica da Kievits e collaboratori (Kievits et al, 1991), permette l'amplificazione selettiva di molecole di RNA mediante l'azione di tre enzimi: la RT del virus della leucemia aviaria, l'RNasiH e la T7 RNA polimerasi. A differenza della PCR, la NASBA è una reazione isotermica che può avvenire in un normale bagnomaria a 41°C, temperatura alla quale i tre enzimi sono attivi contemporaneamente e per tutta la durata del processo. La reazione, illustrata nella figura 7, avviene mediante cicli continui ripetuti di retrotrascrizione e trascrizione di RNA e si compone delle seguenti fasi:

1) ibridazione del primer antisenso, che possiede una coda contenente la sequenza del promotore per la T7 RNA polimerasi, alla sequenza complementare dell'RNA bersaglio a polarità positiva;

2) trascrizione del filamento di DNA a polarità negativa ad opera della RT; in questa fase avviene l'incorporazione del promotore per la T7 nel filamento di DNA neoformato;

3) degradazione del filamento di RNA a polarità positiva ad opera dell'RNasiH;

4) ibridazione del primer senso al filamento di DNA;

5 e 6) la RT polimerizza il filamento di DNA a polarità positiva, producendo così DNA doppia catena che contiene il promotore per la T7 RNA polimerasi;

7 e 8) trascrizione di migliaia di filamenti di RNA a polarità negativa ad opera della T7 RNA polimerasi;

9-12) l'RNA neoformato, a sua volta, rientra nel ciclo di amplificazione attraverso la sintesi di DNA doppia catena identico a quello ottenuto al punto 6;

13) dal DNA doppia catena si possono nuovamente ottenere migliaia di filamenti di RNA a polarità negativa.

NASBA è molto efficiente in quanto si ottengono amplificazioni dell'ordine di 10^9 in 90 minuti (Malek et al, 1992) e, rispetto alla PCR, ha sensibilità e linearità uguale o superiore (Saag et al, 1996). La reazione è inoltre meno suscettibile alle contaminazioni in quanto il prodotto di amplificazione, RNA a singola catena, è molto più labile rispetto al DNA. Accanto a questi innegabili vantaggi rispetto alla PCR, NASBA presenta alcuni svantaggi: procedura di estrazione dell'acido nucleico laboriosa che rende difficile processare più di dieci campioni contemporaneamente; apparecchiatura per la misurazione dei prodotti di reazione piuttosto costosa; tecnica complessa che può essere difficile sviluppare e mettere a punto nei laboratori diagnostici. E' stato probabilmente quest'ultimo punto che ha penalizzato

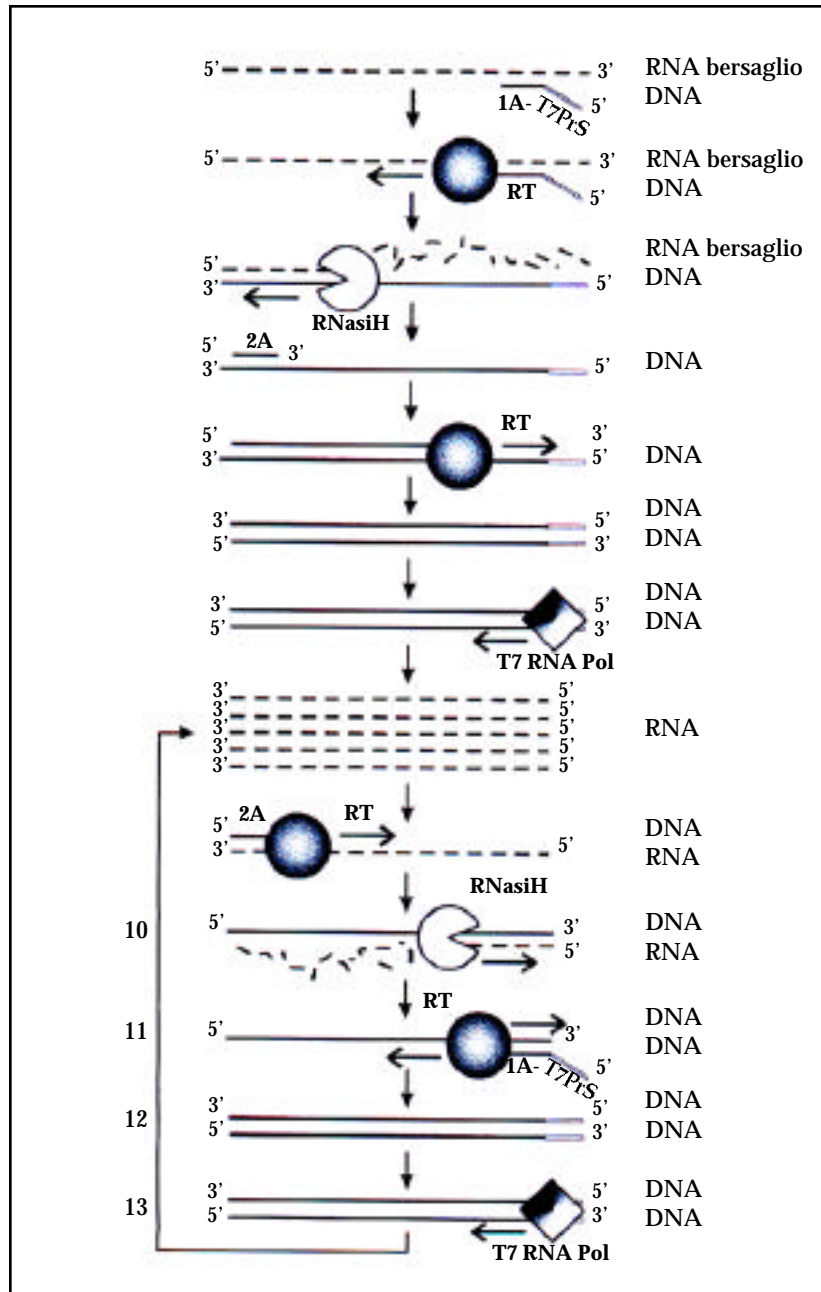


Figura 7. Rappresentazione schematica della NASBA.

fortemente la sua diffusione rispetto alla PCR; NASBA ha infatti trovato applicazione limitata nel campo biomedico. Per la diagnostica virologica, ad esempio, ad oggi sono presenti sul mercato solo sistemi di quantificazione di HIV-1 su plasma e di rilevazione dell'RNA messaggero della proteina p65 di CMV negli LSP.

Dal punto di vista metodologico, rispetto alla PCR quantitativa, NASBA prevede la quantificazione dei campioni mediante una curva standard interna ottenuta con tre standard (chiamati anche calibratori) aggiunti prima della fase di estrazione e che vengono coamplificati con l'acido nucleico bersaglio. Al termine dell'amplificazione il campione viene aliquotato in quattro provette a ciascuna delle quali viene aggiunto una sonda specifica per i tre calibratori e per il campione. Le sonde sono marcate con un atomo di Rutenio che, in presenza di un opportuno substrato, emette un segnale elettrochemioluminescente che viene registrato ed elaborato da apposito strumento. Il risultato finale sarà costituito quindi da curve di taratura propria, una ciascuna per il campione e per gli standard dalle quali sarà possibile calcolare esattamente il numero di copie della sequenza bersaglio tenendo conto anche delle perdite avvenute durante la fase di estrazione.

bDNA

La Branched DNA Signal Amplification o bDNA è una tecnica basata sull'amplificazione del segnale (Urdea et al, 1991) (figura 8) che consente la ricerca quantitativa di genomi virali. Questo metodo è dotato di buona riproducibilità e semplicità di esecuzione ed è inoltre caratterizzato da un rischio di contaminazione minore rispetto alla PCR, ma anche da un limite di sensibilità lievemente inferiore rispetto ai metodi di amplificazione genomica.

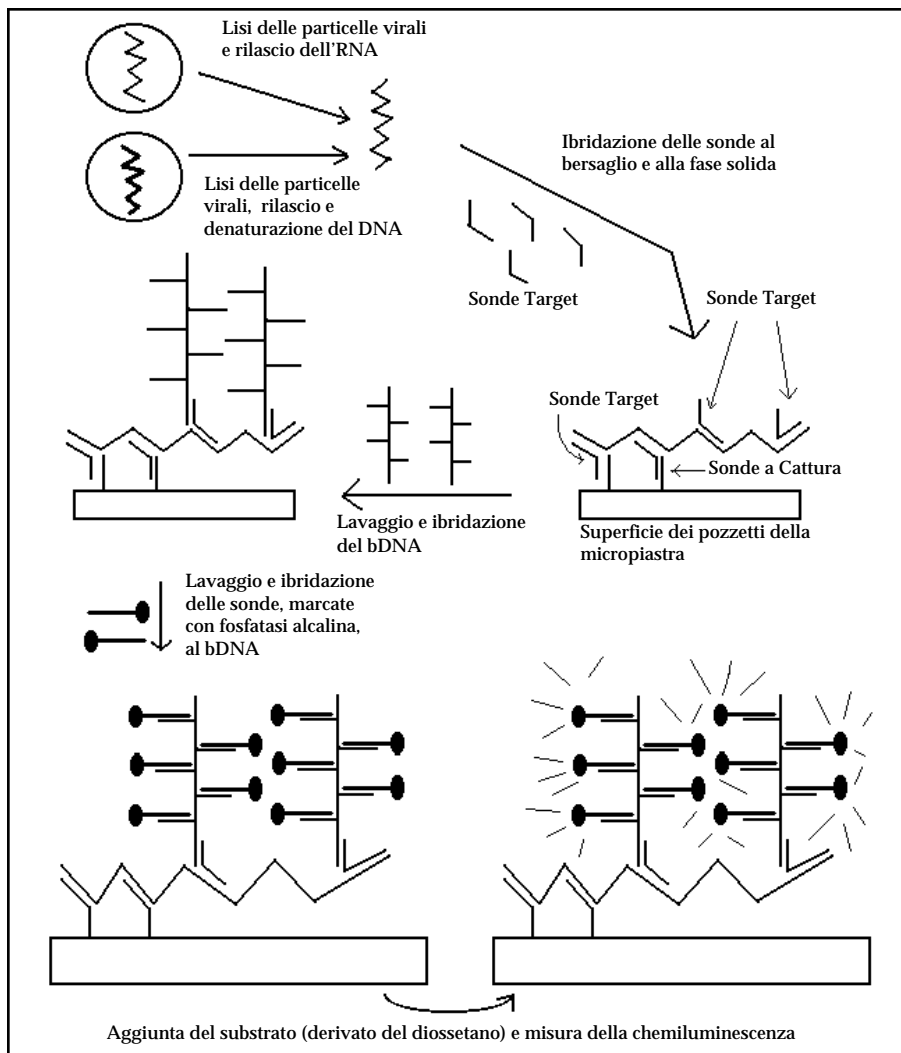


Figura 8. Rappresentazione schematica della tecnica del bDNA.

Sono disponibili Kit commerciali per misurare la concentrazione del genoma ad RNA di HCV ed HIV-1 nel plasma ed il genoma a DNA di CMV dagli LSP.

Il metodo inizia con la lisi delle particelle virali mediante agenti denaturanti per far avvenire il rilascio del genoma. L'acido nucleico virale viene quindi catturato da oligonucleotidi detti **sonde a cattura** sulla superficie di pozzetti di micropiastre (fase solida). Tramite una serie di ibridazioni successive si legano all'acido nucleico bersaglio numerose molecole ramificate di DNA. La cattura del genoma virale e il suo legame all'oligonucleotide ramificato (bDNA) sono mediati da particolari sonde dette **sonde target**, lunghe circa 50 basi di cui circa 20 servono per legare il genoma virale ibridando con regioni altamente conservate, mentre le altre mediano la cattura o l'ibridazione con il bDNA (tabella 4).

Genoma virale	Gene o Regione genica ibridata	Sonde target totali	Sonde target per la cattura	Sonde target per il bDNA
HIV-1-RNA	pol	49	10	39
HCV-RNA	5'UTR, CORE	27	9	18
CMV-DNA	gB, UL56	43	9	34

Tabella 4. Caratteristiche delle sonde target impiegate nella tecnica del bDNA.

I bDNA sono poi sottoposti a ibridazione con un gran numero di sonde (45 per ogni bDNA) marcate con fosfatasi alcalina, la quale trasforma il substrato diossietano in un prodotto chemiluminescente. L'intensità del segnale luminoso emessa è direttamente proporzionale al numero di genomi virali legati alla fase solida. La misura della concentrazione del genoma è ottenuta per interpolazione automatica con una curva standard ed espressa in **copie/ml** per HIV-1-RNA, **copie/10⁶ cellule** per CMV-DNA ed **equivalenti/ml** per HCV-RNA, intendendo per equivalente di RNA la quantità di virus che genera la stessa intensità di luce di una singola molecola standard.

Tutte le fasi di ibridazione vengono effettuate a 53°C, la fase della cattura ha una durata di 16-18 ore, le altre in genere durano 30', e tra un'ibridazione e l'altra è necessario lavare i pozzetti della micropiastre con una soluzione tampone.

La sensibilità del dosaggio di HCV-RNA ha un limite inferiore di 2x10⁵ equivalenti/ml e non è sensibilmente influenzata dalla variabilità del genotipo e del sottotipo del virus (Detmer et al, 1996; Hawkins et al, 1997).

Il limite inferiore di sensibilità del dosaggio di HIV-1-RNA è di 500 copie/ml ed è pressoché equivalente per i sottotipi virali A-F (Kern et al., 1996). Questa elevata sensibilità è stata ottenuta grazie all'uso di un **preamplificatore** che funge da "ponte" tra il genoma virale e il bDNA. Per questo motivo il metodo è stato chiamato **ES bDNA** (Enhanced-Sensitivity Branched DNA).

Il limite di sensibilità del dosaggio di CMV-DNA è attualmente 4,4x10³ copie/10⁶ cellule (Chernoff et al, 1997).

Sistema a cattura di ibrido

Il Sistema a Cattura di Ibrido (HCS) consente la determinazione della concentrazione di genomi virali coniugando l'alta specificità della reazione di ibridazione tra acidi nucleici alla elevata sensibilità degli immunodosaggi.

Attualmente l'HCS è particolarmente applicato alla ricerca quantitativa del CMV-DNA negli LSP. In questo saggio sono impiegate sonde ad RNA (figura 9) che coprono circa il 16% del genoma virale e due Ab anti-ibrido RNA-DNA (Veal et al, 1996; Mazzulli et al, 1996).

Il pellet di LSP si ottiene da 3,5 ml di sangue intero contenente EDTA attraverso i seguenti passaggi: il campione di sangue viene incubato con un

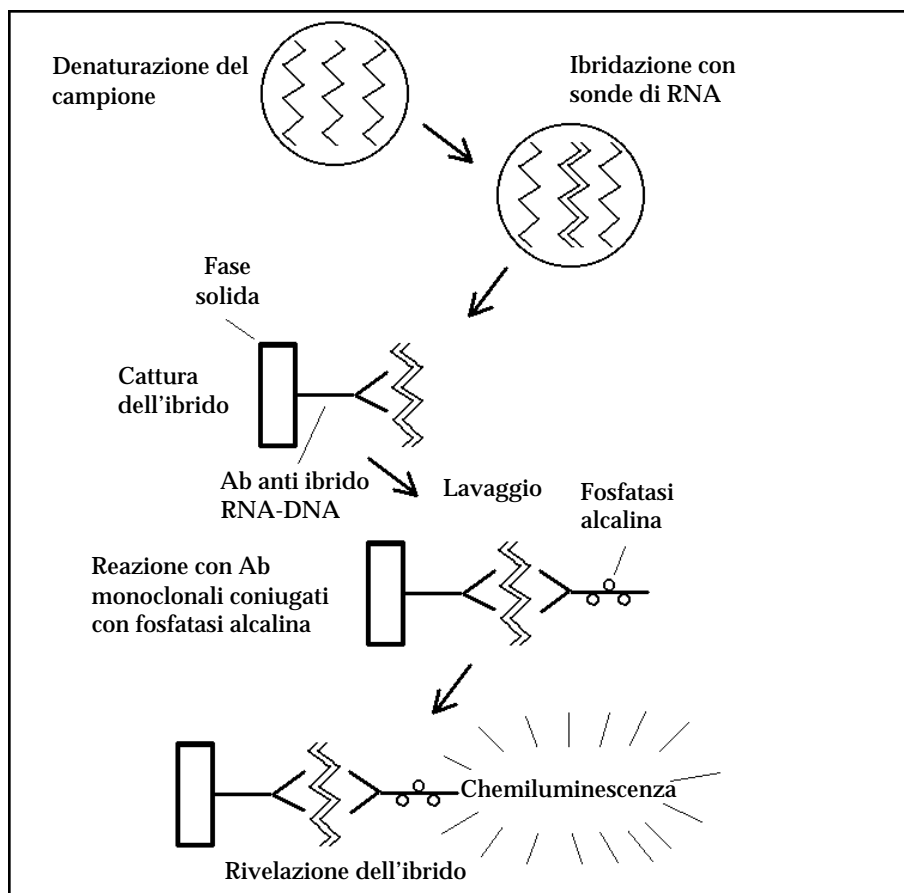


Figura 9. Rappresentazione schematica del Sistema a Cattura di Ibrido.

tampone di lisi dei globuli rossi per 15' a 20-25°C; dopo centrifugazione (15' a 1000 g) viene scartato il surnatante e il pellet viene risospeso in 1,5 ml di tampone di lisi; vengono quindi contate le cellule e, dopo una seconda centrifugazione, si ottiene il pellet finale che può essere anche conservato a -20°C per circa tre mesi.

Successivamente si procede alla lisi della membrana cellulare degli LSP (per consentire il rilascio del genoma virale), alla denaturazione del DNA (50' a 70°C) e infine all'ibridazione del DNA virale a singolo filamento con le sonde di RNA incubando per 2 ore a 70°C (condizioni di alta stringenza).

Gli ibridi RNA-DNA sono quindi trasferiti in provette sulle cui pareti si trovano fissati Ab anti-ibrido RNA-DNA. L'avvenuta reazione Ag-Ab viene rivelata con l'aggiunta di un secondo Ab marcato in grado di dar luogo ad una reazione chemiluminescente (figura 9).

La determinazione della concentrazione del CMV-DNA si effettua con l'uso di una curva standard e i risultati sono espressi direttamente dal luminometro in pg/10⁶ cellule (Veal et al, 1996) o in pg/ml di sangue (Mazzulli et al, 1996).

Recentemente è stato messo a punto un saggio su micropiastra basato sull'HCS per la determinazione della concentrazione plasmatica di HIV-1 espressa come numero di copie/ml. Questo metodo prevede: la concentrazione dei virioni per centrifugazione, la lisi delle particelle virali, l'ibridazione del genoma virale con sonde a DNA biotinilate, la cattura degli ibridi risultanti ad opera di streptavidina legata sulla superficie di pozzetti di micropiastre, la reazione degli ibridi catturati con Ab anti-ibrido RNA-DNA coniugati con fosfatasi alcalina e lo sviluppo di una reazione chemiluminescente che determina emissione di luce, la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione del genoma di HIV-1. Sono impiegati cinque calibratori fino ad una concentrazione di 10⁷ molecole/ml e il limite di sensibilità è di 500 copie/ml.

Genotipizzazione e individuazione di mutazioni che conferiscono resistenza agli agenti antivirali

Queste indagini vengono effettuate soprattutto mediante l'impiego del Line Probe Assay o LiPA. Il LiPA ha, a tutt'oggi, due tipi di applicazione:

- individuazione dei genotipi e sottotipi di HCV;
- individuazione di mutanti di HIV-1 resistenti a determinati farmaci antivirali.

HCV

Molti studi clinici (Tsubota et al, 1994; Orito et al, 1994; Nousbaum et al, 1995) indicano che le infezioni da HCV con genotipo 1b sono scarsamente sensibili al trattamento con α -IFN in quanto le risposte positive a lungo termine riguardano meno del 10% dei pazienti trattati, mentre per i genotipi 1a, 2a, 2b e 3a le risposte positive oscillano tra il 50 e l'80%. La discriminazione dei tipi e sottotipi è quindi di particolare importanza prognostica poiché (Qu et al, 1994) la risposta al trattamento con α -IFN sembra essere indipendente dall'età, dal sesso e dalla durata della malattia. Il LiPA consente la determinazione dei sei genotipi di HCV e di svariati loro sottotipi. Il saggio è basato sulle diversità nella regione 5' UTR tra i differenti genotipi e sottotipi di HCV.

Ancora da definire è il significato della presenza di mutazioni a livello di una parte del gene NS5a definita come ISDR (interferon sensitivity determining region).

HIV-1

Ci sono almeno due approcci per avere informazioni circa l'esistenza di mutanti HIV-1 resistenti ai farmaci: la fenotipizzazione e la genotipizzazione.

Fenotipizzazione

E' la misura della sensibilità effettiva del virus ai farmaci. Nella sua forma classica richiede l'isolamento del virus del paziente in colture cellulari

e la valutazione della sua crescita in presenza di concentrazioni decrescenti dei vari farmaci.

In alternativa è stato proposto il cosiddetto **RT-Antivirogramma** (sistema automatico specificamente disegnato per determinare la resistenza fenotipica ai farmaci). Il gene *pol* viene isolato dall'RNA plasmatico, amplificato con PCR e successivamente inserito in RNA genomici di HIV-1. La sensibilità di questi ibridi ai vari agenti antivirali è poi determinata usando un saggio standardizzato di facile lettura ma che richiede almeno 4-5 settimane di coltura.

Genotipizzazione

È più veloce e più semplice della fenotipizzazione e serve ad identificare le mutazioni puntiformi che conferiscono resistenza. È quindi un modo indiretto per rivelare la presenza di mutanti resistenti. Deve essere usato con cautela per es. riguardo alla mutazione dell'aminoacido 184 come marcatore di resistenza alla lamivudina (tabella 3 e 5). Si può effettuare in due modi:

1) sequenziamento diretto preceduto da PCR per amplificare i segmenti genici in cui compaiono le mutazioni;

2) RT-PCR seguita da ibridazione con sonde specifiche (LiPA)

Il LiPA applicato alla ricerca di mutanti di HIV-1 resistenti a certi farmaci antivirali (NRTI) consente la simultanea rivelazione di sequenze nucleotidiche mutanti che riguardano i codoni 41, 69, 70, 74, 184, 214 e 215 (Stuyver et al, 1997).

Principio del LiPA

Sono impiegate strisce di membrana di nitrocellulosa sulle quali si trovano legate sonde specifiche.

Nel LiPA per genotipizzare HCV è amplificato un frammento della regione 5' UTR lungo 250 bp e vengono impiegate 21 sonde specifiche, lunghe circa 20 bp, per 21 linee. Nel LiPA per individuare mutanti HIV-1 resistenti agli NRTI è amplificato un frammento del gene *pol* lungo 640 bp e vengono utilizzate 33 sonde specifiche, la cui lunghezza varia da 12 a 15 nucleotidi, per 20 linee.

I prodotti amplificati con **nested PCR** e marcati con biotina vengono fatti ibridare con le sonde della membrana (figura 10). La biotina è incorporata durante la seconda fase di amplificazione grazie all'impiego di primers 5'-biotinilati. Il prodotto marcato ibridizza solo con la sonda perfettamente complementare.

L'alta specificità del saggio è ottenuta grazie all'impiego di stringenti condizioni di ibridazione ($50^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$). Dopo l'avvenuta ibridazione viene

Linea		Interpretazione	Commento
3	M41	TS 41	Codone 41: TS per M (ATG)
4	L41 (TTG)	TM 41	Codone 41: TM per L (TTG)
5	L41 (CTG)	TM 41	Codone 41: TM per L (CTG)
6	T69K70	TS 69	Codone 69: TS per T (ACT)
		TS 70	Codone 70: TS per K (AAA)
7	T69R70	TS 69	Codone 69: TS per T (ACT/A)
		TM 70	Codone 70: TM per R (AGA)
8	D69K70	TM 69	Codone 69: TM per D (GAT)
		TS 70	Codone 70: TS per K (AAA)
9	D69R70	TM 69	Codone 69: TM per D (GAT)
		TM 70	Codone 70: TM per R (AGA)
10	N69R70	TM 70	Codone 69: Sequenza per N (AAT)
			Codone 70: TM per R (AGA)
11	L74V75	TS 74	Codone 74: TS per L (TTA)
			Codone 75: Sequenza per V (GAT/G)
12	V74V75	TM 74	Codone 74: TM per V (GTA)
			Codone 75: Sequenza per V (GTA)
13	M184	TS 184	Codone 184: TS per M (ATG)
14	V184	TM 184	Codone 184: TM per V (GTG)
15	F214T215	TS 215	Codone 214: Sequenza per F (TTT/C)
			Codone 215: TS per T (ACC)
16	L214T215	TS 215	Codone 214: Sequenza per L (CTT)
			Codone 215: TS per T (ACC)
17	T215	TS 215	Codone 215: TS per T (ACT)
18	F214Y215	TM 215	Codone 214: Sequenza per F (TTT)
			Codone 215: TM per T (TAC)
19	L214Y215	TM 215	Codone 214: Sequenza per L (CTT)
			Codone 215: TM per Y (TAC)
20	F214F215	TM 215	Codone 214: Sequenza per F (TTT)
			Codone 215: TM per F (TTC)

Tabella 5. Mutazioni, individuate con il LiPA, che possono conferire resistenza agli NRTI. TS = Tipo Selvaggio (Wild Type); TM = Tipo Mutante. Le sigle utilizzate per identificare gli aminoacidi sono elencate nella tabella 3.

aggiunta alla membrana streptavidina marcata con fosfatasi alcalina che si lega agli ibridi biotinilati precedentemente formati. L'incubazione successiva con il substrato costituito da una soluzione di bromocloroindolilfosfato (BCIP/NBT) determina la formazione di un precipitato scuro e quindi di una banda.

In ambedue i test, la lettura dei risultati è facilitata dall'utilizzo di carte di interpretazione (figura 11 e tabella 5 e 6).

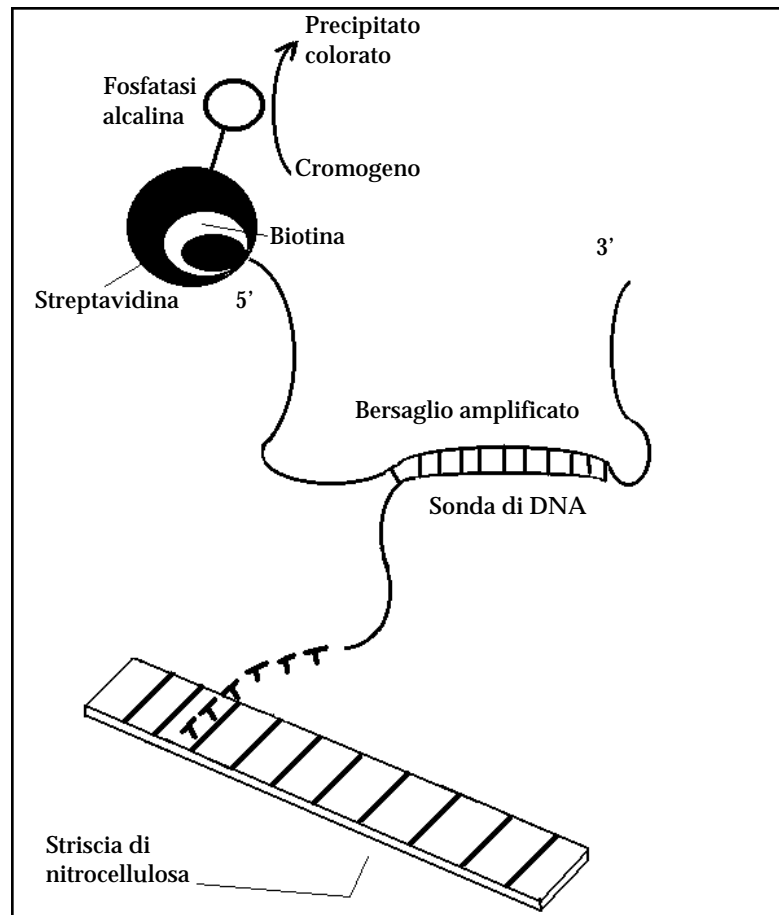


Figura 10. Rappresentazione schematica del LiPA.

Altri metodi impiegati per genotipizzare HCV

Per genotipizzare HCV possono essere utilizzati altri metodi:

- sequenziamento di prodotti di varie regioni del genoma amplificati con RT-PCR;
- nested RT-PCR utilizzando primers tipo-specifici seguita da elettroforesi su gel d'agarosio;
- DNA Enzyme Immunoassay (DEIA), che consiste in una RT-PCR con primers universali e sottotipo specifici seguita da un'ibridazione dei prodotti amplificati con sonde tipo/sottotipo-specifiche legate sul fondo dei

Singole Mutazioni	Composto	Cross-resistenza
M41L	AZT (circa 4 volte)	
T69D	ddC (< 10 volte)	
K70R	AZT (circa 4 volte)	PMEA
L74V	ddI (< 20 volte)	ddC, ? Abacavir
M184V	3TC (> 500 volte)	ddC, ddI, ? Abacavir
Assente 184	3TC (M184I)	
T215F/Y	AZT (circa 16 volte)	
Assente T215	ddC (215C può essere rivelata sulla precedente 215Y)	
Combinazione di mutazioni	Composto/i	Cross-resistenza
41L + 215F/Y	AZT (circa 60 volte)	ddC, ddI
41L + 215F/Y + 184V	3TC	ddC, ddI, ? Abacavir
41L + 215F/Y + 70R	AZT (> 100 volte)	ddC, ddI
41L + 215F/Y + 74V	ddI	ddC
41L + 215F/Y + 69D	AZT + ddC	
41L + 69D	AZT	

Tabella 6. Interpretazione delle mutazioni rivelate dal LiPA HIV-1 RT. Tra parentesi è indicata l'entità della diminuzione della sensibilità del virus al farmaco.

pozzetti di una micropiastra; il DNA ibrido (bersaglio + sonda) è rivelato dall'aggiunta di un Ab monoclonale anti-DNA a doppio filamento e da quella di un secondo Ab anti-IgG marcato con perossidasi che catalizza una reazione colorimetrica (Viazov et al, 1994);

- analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP) (Mc Omish et al., 1994);

- tipizzazione sierologica, che rileva la presenza di anticorpi verso peptidi sintetici e antigeni ricombinanti gruppo-specifici con un saggio immunoenzimatico (Tanaka et al, 1994).

Conclusioni

Ogni metodo in grado di misurare la carica virale presenta vantaggi e limiti. In genere i metodi di amplificazione genomica come la PCR e il NASBA sono più sensibili, ma spesso anche più indaginosi e più soggetti a contaminazione. Gli altri metodi di biologia molecolare come la tecnica del bDNA o il Sistema a Cattura di Ibrido sono meno sensibili ma anche più facilmente eseguibili e meno soggetti a contaminazione.

Spesso solo il valore della concentrazione del genoma virale ha significato predittivo sull'andamento e sull'esito della terapia. Quando però è possibile, è preferibile ricorrere al dosaggio degli Ag virali sia perché i metodi immunochimici sono più standardizzati rispetto alle tecniche di biologia molecolare, sia perché i costi del saggio in immunofluorescenza e di quello immunoenzimatico sono notevolmente inferiori.

Per poter stabilire l'efficacia di un trattamento antivirale è necessario verificare nel tempo un notevole abbassamento della carica virale e, sebbene gli studi in questo settore siano ancora da approfondire, tuttavia le ricerche condotte fino ad oggi hanno permesso di individuare, almeno per certe terapie, l'entità della riduzione indicativa di efficacia terapeutica.

Inoltre il recente impiego di particolari tecniche di biologia molecolare come il LiPA consente di rivelare la presenza nell'organismo di mutanti resistenti a determinati farmaci indirizzando conseguentemente il clinico verso la scelta di farmaci veramente efficaci.

Il laboratorio di Virologia ha quindi a tutt'oggi due importanti ruoli, uno tradizionale finalizzato alla diagnosi delle infezioni virali e l'altro, di recente acquisizione, legato al controllo dell'efficacia delle chemioterapie antivirali.

* * *

L'Unità Operativa di Virologia dell'Azienda Ospedaliera Pisana è ormai da alcuni anni particolarmente attiva nel campo della ricerca qualitativa e quantitativa di genomi virali in vari materiali patologici. Da vari anni effettua il monitoraggio dell'efficacia di chemioterapie anti-HCV, anti-HIV-1 e anti-CMV impiegando alcuni dei saggi di biologia molecolare descritti e, dall'inizio del 1998, anche l'individuazione dei mutanti HIV-1 resistenti agli NRTI.

Bibliografia

1. Aiuti F., Buscè C., Dianzani F., et al. Consensus conference on laboratory markers in HIV infection. *J. Biol. Regul. Homeost. Agent* 1995; 9: 119-120.
2. Bendinelli M., Chezzi C. Fumarola D., Pitzurra M. *Microbiologia Medica - Gli agenti infettivi dell'uomo: biologia, azione patogena, laboratorio.* Monduzzi Editore, Bologna 1992.
3. Bean B. Antiviral therapy: current concepts and practices. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992; 5 (2): 146-182.
4. BHIVA Guidelines Co-ordinating Committee. British HIV Association guidelines for antiretroviral treatment of HIV seropositive individuals. *Lancet* 1997; 349: 1086-1092.
5. Brillanti S., Garson J., Foli M., et al. A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa-resistant chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1994; 107: 812-817.
6. Cammarota G., Maggi M., Vatteroni M.L., et al. Partial nucleotide sequencing of six subtype 2c hepatitis C viruses detected in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33 (10): 2781-2784.
7. Carpenter C. C., Fischl M. A., Hammer S. M., et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1996. Recommendations of an international panel. *International AIDS Society-USA. JAMA* 1996; 276 (2): 146-154.
8. Carpenter C. C., Fischl M. A., Hammer S. M., et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997. Updated recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 1997; 277 (24): 1962-1969.
9. Chemello L., Cavalletto L., Casarin C., et al. Persistent hepatitis C viremia predicts late relapse after sustained response to interferon alfa in chronic hepatitis C. *Annals of Internal Medicine* 1996; 124: 1058-1060.
10. Chernoff D. N., Miner R. C., Hoo B. S., et al. Quantification of Cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes by a branched-DNA signal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35 (11): 2740-2744.

11. Clementi M., Menzo S., Bagnarelli P., et al. Quantitative PCR and RT-PCR in virology. *PCR Meth. and Appl.* 1993; 2: 191-196.
12. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991; 359: 91-92.
13. Coste J., Montes B., Reynes J., et al. Comparative evaluation of three assays for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Med. Virol.* 1996; 50: 293-302.
14. De Clercq. Basic approaches to anti-retroviral treatment. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 1991; 4: 207-218.
15. De Clercq E. HIV inhibitors targeted at the reverse transcriptase. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1992; 8: 119-134.
16. De Clercq E. HIV-1-specific RT inhibitors: highly selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 that are specifically targeted at the viral reverse transcriptase. *Med. Res. Rev.* 1993; 13: 229-258.
17. De Clercq E. Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8 (2): 200-239.
18. Derse D., Cheng Y. C., Furman P. A., et al. Inhibition of purified human and herpes simplex virus-induced DNA polymerases by 9-(hydroxyethoxymethyl) guanina triphosphate. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 11447-11451.
19. Detmer J., Lagier R., Flynn J., et al. Accurate quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA from all HCV genotypes by using branched-DNA technology. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34: 901-907.
20. Di Bisceglie A., Shindo M., Fong T. L., et al. A pilot study of ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* 1992; 16: 649-654.
21. Elion G. B., Fueman P. A., Fyfe J. A., et al. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977; 74: 5716-5720.
22. Eriksson B., Helgstrand E., Johansson N. G., et al. Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 1977; 11: 946-951.
23. Field A. K., Davies M. E., DeWitt H. C., et al. 9-(2-Hydroxy-1-(hydroxy-

- methyl)ethoxy)methyl) guanina: a selective inhibitor of herpes group replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983; 80: 4139-4143.
24. French Multicenter Study Group. Ribavirin-Interferon vs Interferon alone in non responders to α -IFN in chronic hepatitis C. Hepatology 1996; 24 (4): 356A.
 25. Furman P. A., Fyfe J. A., St. Clair M. H., et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83: 8333-8337.
 26. Gerna G., Revello M. G., Percivalle E., et al. Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral proteins. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 2681-2688.
 27. Gerna G., Revello M. G., Percivalle E. and Morini F. Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 1232-1237.
 28. Gerna G., Furione M., Baldanti F. and Sarasini A. Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients. J. Clin. Microbiol. 1994; 32 (11): 2709-2717.
 29. Goswami B. B., Fujitaki J. and Smith R.A. The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979; 89: 830-836.
 30. Hawkins A., Davidson F. and Simmonds P. Comparison of plasma virus loads among individuals infected with hepatitis C virus (HCV) genotypes 1, 2, and 3 by Quantiplex HCV RNA assay version 1 and 2, Roche Monitor assay, and in-house limiting dilution method. J. Clin. Microbiol. 1997; 35 (1): 187-192.
 31. Ho D. D., Neumann A. U., Perelson A. S., et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature 1995; 373: 123-126.
 32. Kakumu S., Yoshioka K., Wakita T., et al. A pilot study of ribavirin and interferon beta for the treatment of chronic hepatitis C. Gastroenterology 1993; 105: 507-512.

33. Kern D., Collins M., Fultz T., et al. An enhanced-sensitivity branched-DNA assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34 (12): 3196-3202.
34. Kievits T., van Gemen B., van Strijp D., et al. NASBATM isothermal nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J. Virol. Methods* 1991; 35: 273-286.
35. Lau J. Y. N., Davis G. L., Kniffen J., et al. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993; 341: 1501-1504.
36. Malek L., Darasch S., Davey C., et al. Application of NASBATM isothermal nucleic acid amplification method to the diagnosis of HIV-1. *Clin. Chem.* 1992; 38: 458.
37. Martinot-Peignoux M., Marcellin P., Pouteau M., et al. Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995; 22: 1050-1056.
38. Mazzulli T., Wood S., Chua R. and Walmsley S. Evaluation of the Digene hybrid capture system for detection and quantitation of human cytomegalovirus viremia in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34 (12): 2959-2962.
39. McOmish S., Yap P. L., Follet A.C. et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an intentional collaborative survey. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 884-892.
40. Morganti R. Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali. *Caleidoscopio Italiano*, n. 107, Dicembre 1996.
41. Mulder J., Mc Kinney N., Christopherson C., et al. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32 (2): 292-300.
42. Nousbaum J. B., Pol S., Nalpas B., et al. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Ann. Int. Med.* 1995; 122: 161-168.
43. Oberg B. O. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacol. Ther.* 1989; 40: 213-285.

44. Orito E., Mizokami M., Mizoguchi N., et al. Hepatitis C virus serotype 2 responds more favorably to interferon-alpha therapy. *J. Hepathology* 1994; 21: 130-132.
45. Pagliaro L., Craxi' A., Camma C., et al. Interferon-alfa for chronic hepatitis C: an analysis for pretreatment clinical predictors of response. *Hepatology* 1994; 19: 820-828.
46. Pantaleo G., Graziosi C., Fauci A. S. New concept in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328 (5): 327-335.
47. Pershing D. H., Smith T. F. and White T. J. Diagnostic molecular microbiology: principles and application. American Society for Microbiology, Washington D. C., USA, 1993.
48. Pistello M., Maggi F., Vatteroni L., et al. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32: 232-234.
49. Pistello M., Menzo S., Giorgi M., et al. Competitive polymerase chain reaction for quantitating feline immunodeficiency virus load in infected cat tissues. *Mol. Cell. Probes* 1994; 8: 229-234.
50. Qu D., Li J. S., Vitvitski L., et al. Hepatitis C genotypes in France: comparison of clinical features of patients infected with HCV type 1a and 1b. *J. Hepathology* 1994; 21: 70-75.
51. Reichard O., Andersson J., Schvarcz R., et al. Ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Lancet* 1991; 337: 1058-1061.
52. Revello M. G., Furione M., Zavattoni M. and Gerna G. Human cytomegalovirus infection: diagnosis by antigen and DNA detection. *Rev. Med. Microbiol.* 1994; 5 (4): 265-276.
53. Revets H., Marissens D., De Wit S., et al. Comparative evaluation of NASBA HIV-1 RNA QT, AMPLICOR-HIV Monitor, and QUANTIPLEX of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34: 1058 -1064.
54. Richmann D. D. Antiviral Drug Resistance, 1996. Chichester: John Wiley & Sons.
55. Rossi S., Forleo M. L., Spinetti A., et al. Two years treatment with alpha

- lymphoblastoid natural interferon (α -IFNnl) in anti HCV CAH. Congresso Digestive Disease Week, May 19-22, 1996, San Francisco, CA, USA.
56. Rumi M. G., Del Ninno E., Parravicini M. L., et al. A prospective, randomized trial comparing lymphoblastoid to recombinant interferon alfa 2a therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 24: 1366-1370.
 57. Saag M. S., Holodniy M., Kuritzkes D. R., et al. HIV viral load markers in clinical practice. *Nature Med.* 1996; 2: 625-629.
 58. Saracco G., Mesina P., Solinas A., et al. Prolonged therapy (2 years) with interferon alfa-2b for chronic hepatitis C: comparison between two treatment schedules (3 vs 6 mu). Congresso Digestive Disease Week, May 19-22, 1996, San Francisco, CA, USA.
 59. Schinazi R. F., Larder B. L. and Mellors J. W. Mutations in retroviral genes associated with drug resistance. *Int. Antiviral News* 1997; 5 (8): 129-142.
 60. Schupbach J., Flepp M., Pontelli D. et al. Heat-mediated immune complex dissociation and enzyme-linked immunosorbent assay signal amplification render p24 antigen detection in plasma as sensitive as HIV-1 RNA detection by polymerase chain reaction. *AIDS* 1996; 10: 1085-1090.
 61. St. Clair M. H., Richards C. A., Spector T., et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine triphosphate as an inhibitor and substrate of purified human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987; 31: 1972-1977.
 62. Streeter D. G., Witkowski J. T., Khare G. P., et al. Mechanism of action of 1-b-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1973; 70: 1174-1178.
 63. Stuyver L., Wyseur A., Rombout A., et al. Line probe assay (LiPA) for the detection of drug selected variants in HIV-1 reverse transcriptase gene. *Int. Antiviral News* 1997; 5: 38-40.
 64. Tanaka T., Tsukiyama-Kohara K., Yamaguchi K., et al. Significance of specific antibody assay for genotyping of hepatitis C virus. *Hepatology* 1994; 19: 1347.
 65. Tocci M. J., Livcelli T. J., Perry H. C., et al. Effects of the nucleoside

analog 2'-nor-2'-deoxyguanosina of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 1984; 25: 247-252.

66. Tsubota A., Chayama K., Ikeda K., et al. Factors predictive of response to interferon-alfa therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994; 19:1088-1094.
67. Urdea M. S., Horn T., Fultz T. J., et al. Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1991; 24: 197-200.
68. Veal N., Payan C., Fray D., et al. Novel DNA assay for cytomegalovirus detection: comparison with conventional culture and pp65 antigenemia assay. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34 (12): 3097-3100.
69. Viazov S., Zibert A., Ramakrishnan K., et al. Typing of hepatitis C virus isolates by DNA enzyme immunoassay. *J. Virol. Methods* 1994; 48: 81.
70. Yarchoan R., Mitsuya H., Myers C. E. and Broder S. Clinical pharmacology of 3'-azido-3'-deoxythymidine (zidovudine) and related dideoxynucleosides. *N. Engl. J. Med.* 1989; 321: 726-738.

Ringraziamenti

Gli Autori ringraziano il Prof. Mauro Bendinelli, direttore dell'U.O. Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Pisa, per l'incoraggiamento ed i consigli ricevuti durante la stesura della monografia..

Indice

Editoriale	pag.	3
Introduzione	»	5
Infezione da HCV	»	8
Interferone	»	8
Ribavirina	»	9
Fattori che influenzano la risposta alla terapia	»	10
Dosaggio sierico di HCV-RNA	»	11
Infezione da HIV-1	»	12
Inibitori della Trascrittasi Inversa (RTI)	»	12
Analoghi dei substrati (nucleosidici)	»	12
Analoghi non nucleosidici	»	13
Inibitori della proteasi	»	14
Resistenza del virus ai farmaci	»	14
Combinazione di terapie	»	17
Dosaggio plasmatico di HIV-1-RNA	»	18
Infezione da CMV	»	19
Acyclovir	»	19
Ganciclovir	»	19
Foscarnet	»	20
Misura della carica virale	»	20
Ricerca di antigeni virali	»	21
Citomegalovirus	»	21
Antigenemia da CMV	»	21
Viremia (o Saggio con shell vial) da CMV	»	21
Virus dell'immunodeficienza umana	»	23
PCR quantitativa	»	24
NASBA	»	29
bDNA	»	32
Sistema a cattura di ibrido	»	34

Genotipizzazione e individuazione di mutazioni che conferiscono	
resistenza agli agenti antivirali	» 36
HCV	» 36
HIV-1	» 36
Fenotipizzazione	» 36
Genotipizzazione	» 37
Principio del LiPA	» 37
Altri metodi impiegati per genotipizzare HCV	» 39
Conclusioni	» 42
Bibliografia	» 43
Indice	» 50

Caleidoscopio

Italiano

1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesita'*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali del - l'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 -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 e 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. Piattino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriagonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterina nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M., Biordi L., Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., 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 Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodel - lamento 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.: *Im - munoflogosi 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 prin - cipi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98. La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.
101. Cogato I. Montanari E.: *La Sclerosi Multipla*. Aprile '96.
102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale*. Maggio '96.
103. Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giu - gno '96.
104. Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.
105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: *Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tis - sutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative*. Ottobre '96.

106. Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: *Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*. Novembre '96.
107. Morganti R.: *Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*. Dicembre '96.
108. Andreoni S.: *Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*. Gennaio '97.
109. Salemi A., Zoni R.: *Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*. Febbraio '97.
110. Meisner M.: *Procalcitonina*. Marzo '97.
111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: *Malattie a trasmissione sessuale (2)*. Aprile '97.
112. Palleschi G., Moscone D., Compagnone D.: *Biosensori elettrochimici in Biomedicina*. Maggio '97.
113. Valtriani C., Hurle C.: *Citofluorimetria a flusso*. Giugno '97.
114. Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barucci P.: *Alcol e problemi correlati*. Settembre '97.
115. Piccinelli M.: *Depressione Maggiore Unipolare*. Ottobre '97.
116. Pepe M., Di Gregorio A.: *Le Tiroiditi*. Novembre '97.
117. Cairo G.: *La Ferritina*. Dicembre '97.
118. Bartoli E.: *Le glomerulonefriti acute*. Gennaio '98.
119. Bufi C., Tracanna M.: *Computerizzazione della gara di Laboratorio*. Febbraio '98.
120. National Academy of Clinical Biochemistry: *Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide*. Marzo '98.
121. Fava G., Rafanelli C., Savron G.: *L'ansia*. Aprile '98.
122. Cinco M.: *La Borreliosi di Lyme*. Maggio '98.
123. Giudice G.C.: *Agopuntura Cinese*. Giugno '98.
124. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (I)*. Luglio '98.
125. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Basofili*. Settembre '98.
126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: *Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo I*. Novembre '98.
127. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (II)*. Dicembre '98.
128. Muzi P., Bologna M.: *Tecniche di immunoistochimica*. Gennaio '99.
129. Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: *Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali*. Febbraio '99.

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 17, numero 129

Direttore Responsabile

Sergio Rasso
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0338 2202502
E-mail: rasso@ssnet.it

Responsabile Ufficio Acquisti
Giusi Cunietti

EDITORE



Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Letizia Cuccuru

Servizio Abbonamenti

Fina Grandeppieno
Flavio Damarciasi

...il futuro ha il cuore antico  **MEDICAL SYSTEMS SpA**

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

Internet URL: <http://medicalsistemas.editoria.com> e <http://www.medicalsistemas.it>
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay,
Guida Pratica Immulite®, Caleidoscopio, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Pandora,
Journal of Preventive Medicine and Hygiene, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa

Tipolitografia ATA
16143 Genova - Via G. Torti, 32 c.r.
Tel. (010) 513120 - Fax (010) 503320

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

Finito di stampare: Febbraio 1999
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