



UNIVERSITÀ DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia

Direttore Prof. Carlo Garzelli

TESI DI SPECIALIZZAZIONE

**Valutazione della prevalenza dell'allele HLA-B*57:01
in una popolazione di pazienti
con infezione da HIV-1**

Relatore

Ch.mo Prof. Mauro Pistello

Candidata

Dott.ssa Laura Corvo

Correlatore

Ch.mo Prof. Leonardo Calza

Anno Accademico 2014/2015

INDICE

Riassunto	3
Introduzione	5
Le caratteristiche del virus HIV	5
Il ciclo replicativo di HIV	11
Gli antigeni e la variabilità del genoma di HIV	14
Evoluzione clinica dell'AIDS	18
Patogenesi dell'AIDS	25
La diagnosi di infezione da HIV	28
La terapia farmacologica	31
Fallimento terapeutico e controllo dell'AIDS	34
Il complesso maggiore di istocompatibilità	35
Farmacogenetica	38
Abacavir ed allele HLA-B*57:01	40
PARTE SPERIMENTALE	
Obiettivo della tesi	45
Materiali e Metodi	46
Estrazione del DNA	46
Quantificazione del DNA	47
Amplificazione di sequenze specifiche di DNA mediante SSP-PCR	48
Elettroforesi in gel di agarosio	51
Interpretazione dei risultati	54
Raccolta dati	55
Risultati	56
Discussione e Conclusioni	64
Bibliografia	66

RIASSUNTO

La possibilità di predire la risposta farmacologica di un paziente sulla base del corredo genetico dell'individuo stesso è il concetto base della *farmacogenetica*. Per farmacogenetica si intende, infatti, lo “studio delle variazioni nelle caratteristiche del DNA in relazione alla risposta ai farmaci”. Lo sviluppo di questa branca della farmacologia generale è derivato innanzitutto dalla notevole quantità di informazioni riguardanti il genoma umano divenute accessibili all'intera comunità scientifica al completamento del Progetto Genoma Umano. Ciò che ha reso veramente possibile l'affermarsi della medicina personalizzata è stato lo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche, altamente sensibili, specifiche e poco costose, in grado di analizzare in tempi brevi milioni di polimorfismi collegati al profilo individuale di risposta ad un farmaco.

Con l'introduzione dei test genetici nella pratica clinica è possibile valutare a priori il rischio di eventi avversi e quindi di evitare di somministrare farmaci che potrebbero danneggiare il paziente. In Europa il primo test farmacogenetico ufficialmente riconosciuto valido ai fini delle informazioni per l'uso di un farmaco è la *ricerca dell'allele HLA-B*57:01* per l'agente *abacavir*. E' stato dimostrato infatti che l'allele HLA-B*57:01 in pazienti con infezione da HIV ha un significato altamente predittivo per l'individuazione dei soggetti ipersensibili. Abacavir è un inibitore nucleosidico della trascrittasi inversa, altamente efficace ed è approvato per il trattamento dell'HIV in combinazione con altri antiretrovirali. Sfortunatamente, però, il 4-8% di persone trattate mostrano una reazione di ipersensibilità a questo farmaco. La reazione sistemica avviene nelle prime 6 settimane di trattamento e può condurre a pesanti conseguenze patologiche. Le Linee Guida sull'utilizzo dei farmaci antiretrovirali raccomandano, quindi, fortemente l'esecuzione del test farmacogenetico prima di iniziare una terapia antiretrovirale contenente abacavir.

Nell'anno 2014 l'Infettivologo responsabile dell'Ambulatorio di Malattie Infettive dell'Ospedale Maggiore di Bologna (sede distaccata dell'Unità Operativa di Malattie Infettive del Policlinico S. Orsola-Malpighi), in accordo con il Laboratorio Analisi dell'Ospedale Maggiore – settore di Biologia Molecolare e Citogenetica – ha programmato un piano di screening per la ricerca dell'allele HLA-B*57:01. Nel

corso dell'intero anno sono stati screenati 788 pazienti afferenti all'Ambulatorio di Malattie Infettive.

La procedura di analisi prevede l'estrazione in manuale del DNA dai linfociti di sangue periferico utilizzando il kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit* della ditta QIAGEN (marcato α IVD). Per l'identificazione dell'allele HLA-B*57:01 è stato utilizzato il kit *HISTO TYPE B57 Happy Pack* (marcato α IVD) che sfrutta la tecnologia SSP-PCR (*Sequence Specific Primers-PCR*). Questo tipo di PCR impiega coppie di primers perfettamente complementari solo con un allele o con un gruppo di alleli, di modo che si verifichi l'amplificazione della sequenza bersaglio solo in presenza della sequenza di interesse. La separazione dei prodotti ottenuti con l'amplificazione è stata effettuata tramite *gel di agarosio in elettroforesi orizzontale*.

Sono stati riportati in un file di Microsoft Excel i risultati ottenuti che hanno permesso di dividere i pazienti in due sottopopolazioni di soggetti positivi e negativi al test. Nell'ambito della sottopopolazione dei soggetti positivi è stata, pertanto, valutata la prevalenza dell'allele HLA-B*57:01. Sono state inoltre analizzate le differenze tra le due sottopopolazioni prendendo in considerazione oltre che l'età, il sesso e la provenienza, anche i seguenti parametri (ottenuti dallo stesso prelievo di sangue): la conta dei linfociti T CD4+, la conta dei linfociti T CD8+, il rapporto CD4+/CD8+ e la carica virale.

INTRODUZIONE

L'agente eziologico della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) è un *Retrovirus*, appartenente al genere *Lentivirus*, denominato **HIV** (*Human Immunodeficiency Virus*). Oggi sono noti due virus responsabili della sindrome da immunodeficienza acquisita umana: **HIV-1** e **HIV-2**. **HIV-1** è diffuso in tutto il mondo ed è responsabile della maggior parte dei casi di AIDS. **HIV-2** è presente soprattutto in Africa occidentale, nei Caraibi e nell'America meridionale, è di gran lunga meno virulento e provoca una malattia a decorso relativamente più attenuato. Nel 1980-81, la segnalazione di focolai di polmonite mortale da *Pneumocystis carinii* associata a segni evidenti di compromissione del sistema immunitario, in giovani adulti per lo più maschi omosessuali (“*gay pneumonia*”) portò, negli USA, alla identificazione della sindrome ed al sospetto che un agente infettante, a trasmissione sessuale, potesse esserne la causa. Nel 1983, il retrovirus HIV fu isolato pressoché contemporaneamente in Francia e negli USA¹ e, già nel 1985, sono stati resi disponibili i primi reattivi per la ricerca degli specifici anticorpi (a scopo diagnostico e per il relativo “screening” dei donatori di sangue).

Le caratteristiche del virus HIV

Il virione di HIV ha una forma quasi-sferica ed un diametro compreso tra i 100 ed i 120 nm. Lo strato più esterno è costituito dal *pericapside* (*peplos* o *envelope*) formato da un doppio strato fosfolipidico sul quale si ancorano proteine virus-specifiche, organizzate a formare peplomeri in genere evidenti. La parte più interna, invece, è costituita dal *nucleocapside* (formato, a sua volta, dal rivestimento proteico capsidico e dal “*core*”) centrale troncoconico contenente oltre al genoma, molecole di tRNA cellulare e gli enzimi *trascrittasi inversa*, *integrasi* e *proteasi*. Il genoma è *diploide*, essendo formato da due molecole *identiche* di RNA monocatenario di *polarità positiva*. Nel virione è presente un enzima assolutamente peculiare,

¹ La prima indicazione che l'AIDS fosse causata da un retrovirus risale al 1983, quando il gruppo di Luc Montagnier dell'Istituto Pasteur (Parigi) pubblicò un lavoro in cui veniva descritto l'isolamento da un paziente affetto da AIDS di un virus contenente una trascrittasi inversa. Nello stesso anno il gruppo di Robert C. Gallo a Bethesda presentò un lavoro in cui non soltanto si descriveva l'isolamento di un retrovirus da una paziente affetto da AIDS, ma si affermava anche che questo virus era molto simile all'HTLV (*Human T Lymphotropic Virus*)-I, isolato nel 1978 dallo stesso ricercatore.

rappresentato dalla cosiddetta “trascrittasi inversa” o *DNA-polimerasi RNA-dipendente*, essenziale per il ciclo replicativo del virus. HIV, infatti, si moltiplica attraverso una sequenza assolutamente caratteristica di eventi che vede inizialmente la trascrizione *inversa* di ciascuna molecola di RNA del virus infettante in una molecola di DNA bcatenario che si integra nel genoma della cellula infetta, dal quale viene poi trascritto (ad opera della RNA-polimerasi II della cellula) l’RNA che provvede sia i messaggeri virus-specifici sia i genomi per la nuova progenie virale. L’assemblaggio delle particelle virali neoformate avviene nel citoplasma contemporaneamente all’acquisizione del pepllos mediante gemmazione attraverso la membrana cellulare (Fig. 1).

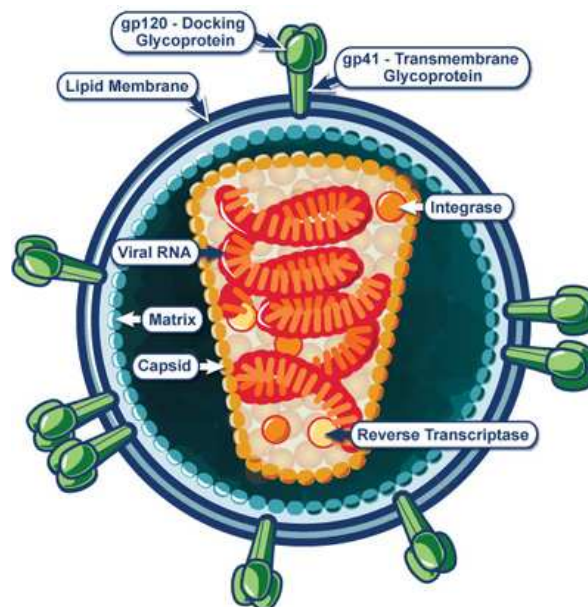


Figura 1 Struttura del virione HIV-1

Il genoma di HIV misura circa 9,2 Kb ed è formato da due molecole di RNA poliadenilate all’estremità 3’ e mantenute insieme, a livello dell’estremità 5’ (probabilmente per il formarsi di legami a idrogeno tra sequenze complementari) in un dimero speculare. A circa un centinaio di nucleotidi dall’estremità 5’, la molecola di RNA genomico è appaiata con una piccola molecola di RNA di origine cellulare costituita da una molecola di RNA-transfer, la cui funzione è quella di fungere da innesco (*primer*) per la trascrittasi inversa. Ciascuna molecola di RNA genomico

presenta agli estremi due sequenze di basi reiterate, delle quali la più esterna è ripetuta (identica) ai due estremi (*sequenze R*), mentre quella più interna è caratteristica (unica) rispettivamente dell'estremità 5' (*sequenza U5*) e dell'estremità 3' (*sequenza U3*). Le sequenze U5 e U3 sono retro-trascritte (per un "salto" della trascrittasi inversa da un estremo all'altro della molecola, con il "trascinamento" del relativo trascritto) ad ambedue gli estremi della molecola di DNA provirale che risulta, di conseguenza, più lunga della molecola di RNA genomico. L'insieme U3-R-U5 presente ad ogni estremo del DNA provirale forma il cosiddetto segmento LTR (*Long Terminal Repeat*) che contiene il *promoter* e l'*enhancer* necessari alla trascrizione del provirus. Le LTR, così come le regioni ad esse adiacenti, definiscono siti che contengono informazioni essenziali per l'inserzione del DNA virale in quello della cellula ospite e per la trascrizione del genoma. Nella regione U3 della LTR 5' sono presenti segnali per l'inizio della trascrizione. In particolare si conosce il ruolo di "potenziatore" (*enhancer*) della regione U3, che incrementa non solo la trascrizione dell'RNA, ma svolge un ruolo essenziale anche nella replicazione del virus. In questa regione, infatti, si trovano due brevi segnali chiamati *CAT box* e *TATA box*. Quest'ultima sequenza rappresenta il promotore per la trascrizione, mentre le *CAT box* sono sequenze coinvolte nella regolazione della trascrizione. Le regioni R e U5 dell'estremità 3' contengono invece i segnali di fine trascrizione. Tra le sequenze adiacenti alle LTR si trova, all'estremità 5', il PBS che funge da sito di legame per il tRNA^{lys} (come spiegato nel dettaglio in seguito).

Il genoma contiene almeno tre geni, necessari e sufficienti alla replicazione completa con formazione di progenie virale. I tre geni si susseguono, dall'estremità 5', nella sequenza: *gag*, *pol* ed *env*. Il gene "*gag*²" codifica le proteine strutturali del *nucleocapside*, il gene "*pol*" (*polymerase*) codifica le proteine enzimatiche (trascrittasi inversa, proteasi, endonucleasi/integrasi) ed il gene "*env*" codifica le proteine che, una volta glicosilate, formano le (glico)proteine virus-specifiche dell'*envelope*. I geni *gag*, *pol* ed *env* sono tradotti in poliproteine che sono poi scisse nelle proteine funzionali definitive, le quali si assemblano insieme alle due molecole di RNA genomico nel virione completo. I geni *gag-pol* sono co-tradotti inizialmente in una poliproteina di 180 kd (p180) che viene poi scissa in una proteina di 55 kd o

² La denominazione deriva dall'acronimo di "*group antigen*" o "*g-Ag*" per la presenza di antigeni di "gruppo" nelle proteine capsidiche di numerosi retrovirus aviari.

p55 (precursore delle proteine codificate da *gag*), e negli enzimi virus-specifici: proteasi (PR) di 11 kd (p11), trascrittasi inversa (RT) di 51/66 kd (p66/51) ed endonucleasi/integrasi (IN) di 32 kd (p32). La proteina p55, a sua volta, viene scissa nelle seguenti proteine funzionali: 1) una proteina di 17 kd (p17) miristilata³ che, legandosi alla faccia interna della zona di membrana cellulare da cui deriverà il peplos virale, rappresenta la “matrice” virale (MA); 2) una proteina di 24 kd (p24) che forma l’involucro del “core” ed uno degli antigeni virali più rappresentativi (*core-antigen* o CA); 3) una proteina di 9 kd (p9) che si lega alle molecole di RNA (proteina nucleo-capsidica o NC).

La *trascrittasi inversa/ribonucleasi H* (RNasi-H) è un eterodimero costituito da due polipeptidi, uno di 66 kd e l’altro di 51 kd. Il dimero è dotato sia di attività DNA-polimerasica RNA-dipendente (TI), sia di attività ribonucleasica. Queste due attività sono esplicate da porzioni diverse dello stesso complesso proteico. La funzione della polimerasi è quella di trascrivere una copia di DNA da uno stampo preesistente di RNA. La sua attività dipende strettamente dalla presenza di ioni Mg^{2+} e richiede come innesco (*primer*) una regione formata da un doppio filamento di RNA. Il *primer* è costituito da uno specifico tRNA_{lys}, complementare a una sequenza PBS (*Primer Binding Site*) localizzata in prossimità dell’estremità 5’ dell’RNA, che si associa al genoma durante il montaggio del virione. Il prodotto della trascrizione è un ibrido RNA-DNA nel quale l’RNA viene degradato dall’RNasi-H, permettendo così la sintesi di un secondo filamento di DNA e la costituzione di un DNA bicatenario (DNA provirale). Inoltre, l’RNasi-H opera il distacco del tRNA dal filamento neoformato di DNA.

Infine, il gene *env* è tradotto inizialmente in una poliproteina (p88) che viene glicosilata (gp160) e scissa nelle due glicoproteine gp41 e gp120, di cui la prima (gp41 con attività fusogena) è inserita attraverso l’involucro lipidico pericapsidico (proteina transmembranaria o TM), mentre l’altra (gp120 con attività recettoriale), ancorata con la porzione COOH- all’estremo NH₂ terminale di gp41, è esposta alla

³ Nella parte aminoterminale di ciascuna molecola p17 viene attuata una modifica post-traduttiva, la *miristilazione*. Essa consiste nel legame di molecole di un acido grasso (acido miristico) a residui di glicina posti nella porzione N-terminale delle proteine. La miristilazione sembra assumere un ruolo fondamentale sia per il legame della p17 alla faccia interna dell’involucro, sia per garantire un regolare montaggio delle glicoproteine dell’involucro nelle fasi tardive della replicazione.

superficie (SU) del virione. Ogni peplomero presente alla superficie del virione è formato da tre eterodimeri gp41-gp120 (Fig. 2).

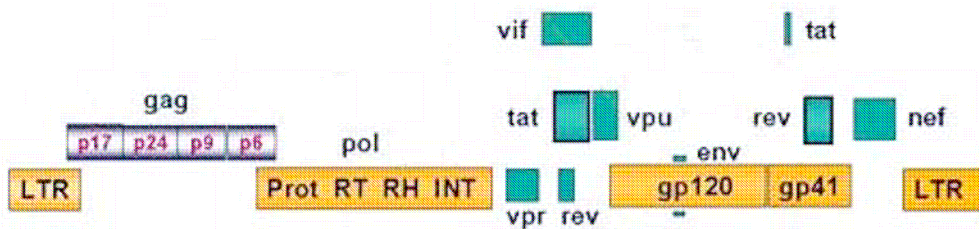


Figura 2 Mappa genomica di HIV-1

Ai due lati del gene *env*, parzialmente embricate tra loro e con la stessa sequenza nucleotidica di *env* (o con la porzione 3' terminale di *pol*), il genoma di HIV contiene altre sei sequenze codificatrici che danno luogo ad altrettante proteine non strutturali con funzioni regolatrici o accessorie nel ciclo di replicazione virale. Le due proteine regolatrici sono rappresentate dalle proteine *Tat* e *Rev*. Ambedue sono codificate da geni formati da due esoni collocati in zone separate del genoma virale e la produzione dei relativi messaggeri presuppone complesse operazioni di elaborazione (*splicing*) dei trascritti iniziali. La proteina *Tat* (*Trans Activator of Transcription*), una volta sintetizzata, rientra nel nucleo cellulare e funziona da transattivatore della trascrizione del genoma provirale. A differenza di altre proteine con la stessa funzione, non si lega al *promoter* della trascrizione virale (situato nella sequenza LTR in posizione 5'), bensì a una specifica sequenza (*Tat-responsive* o TAR) degli RNA messaggeri virali nascenti. Essa non solo favorisce il reclutamento di fattori trascrizionali attivati a livello del promotore provirale, ma agisce sull'RNA-polimerasi II cellulare che, solo a questo punto, risulta capace di portare a termine la completa trascrizione del provirus (senza l'azione di *Tat*, l'attività trascrittiva della polimerasi si arresta poco dopo la sintesi della sequenza TAR). Anche la proteina *Rev*, una volta prodotta, rientra nel nucleo ed interagisce con specifiche sequenze (*Rev-responsive elements* o RRE) presenti nella regione "*env*" degli RNA messaggeri, proteggendoli dalla elaborazione ad opera degli *spliceosomi* nucleari e consentendo l'esportazione dal nucleo degli RNA di maggiori dimensioni (RNA

genomici, RNA messaggeri delle poliproteine codificate da *gag*, *pol* ed *env*). Al tempo stesso, blocca anche la produzione degli RNA messaggeri *multi-spliced* e, di conseguenza, la sintesi della gran parte delle stesse proteine regolatrici. Altre proteine con funzioni “regolatrici” sul ciclo di replicazione virale sono le proteine *Vpu* e *Nef*. La proteina *Vpu* (*Viral Protein U*) facilita il trasporto della glicoproteina gp160, che successivamente viene scissa nelle due glicoproteine gp41 e gp120, verso la membrana cellulare; mentre la proteina *Nef* (*Negative Expression Regulatory Factor*), inizialmente considerata (erroneamente) con una funzione di regolazione negativa della replicazione virale, esplica invece una serie di azioni diverse favorendo la replicazione e l’infettività virale (in collaborazione con *Tat*, facilita la trascrizione del genoma virale ed aumenta la disponibilità di fattori trascrizionali attivati). *Vif* (*Viral Infectivity Factor*) e *Vpr* (*Viral Protein R*) sono invece proteine “accessorie” che vengono incorporate nel virione maturo agevolandone l’infettività. L’azione di *Vif* consiste essenzialmente nel legarsi ad una particolare citosina-deaminasi (denominata APOBEC3G) favorendone la degradazione attraverso il sistema ubiquitino-dipendente. In assenza di *Vif*, APOBEC3G è incorporata durante l’assemblaggio nei virioni neoformati apparentemente attraverso un’interazione con la zona di legame all’RNA della proteina Gag. Successivamente, quando il virione infetta una cellula, si associa al complesso retrotrascrittivo provocando la deaminazione dei residui citidinici (convertendoli in residui uridinici) nella catena (-) nascente del DNA provirale che, a questo punto, viene degradata o, se serve da *template* per la sintesi della catena (+), porta alla produzione di un DNA provirale largamente non funzionale come risultato della ipermutazione C→U. In altre parole, *Vif* consentirebbe al virus di superare una sorta di difesa antivirale intracellulare che sarebbe da aggiungere alla lista dei vari sistemi difensivi “costitutivi” contro le infezioni presenti naturalmente nell’organismo. Infine, la proteina *Vpr* sembra avere un ruolo importante nel favorire il trasporto intranucleare del complesso nucleoproteico (genoma provirale e proteine associate) virale che provvederà alla successiva integrazione del provirus nel genoma cellulare (Fig. 3).

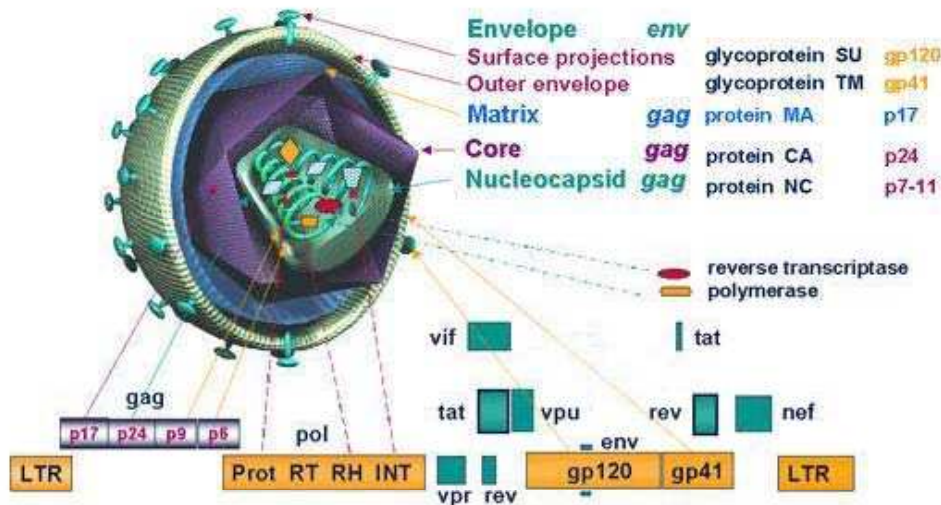


Figura 3 Struttura del virus: geni virali e le proteine da essi codificate

Il ciclo replicativo di HIV

Il principale recettore cellulare specifico per HIV è la molecola **CD4** presente alla superficie dei linfociti *T helper*, e che funziona da ligando specifico per le molecole MHC di classe II nei processi di interazione cellulare legate al “riconoscimento” dell’antigene. La molecola CD4 è presente anche alla superficie di una notevole percentuale dei monociti presenti nel sangue circolante, nei macrofagi tissutali, nelle cellule dendritiche follicolari dei linfonodi, nelle cellule della microglia (di origine macrofagica) dell’encefalo e nelle cellule dendritiche (cellule di Langerhans) della cute e delle mucose. HIV è in grado di infettare (benché con una efficienza di gran lunga inferiore) anche cellule CD4-, come cellule astrocitarie di origine ectodermica, linfociti T CD8+, cellule endoteliali e cellule dell’epitelio intestinale. In queste cellule non è stata mai dimostrata direttamente la presenza di CD4 sulla membrana. E’ possibile ipotizzare quindi che in queste cellule il recettore CD4 sia espresso in bassissime quantità, tali da non renderlo rilevabile, o che esistano dei “recettori” alternativi. Altri recettori proposti comprendono il galattocerebroside, recettore usato da HIV sulle cellule epiteliali intestinali e particolarmente abbondante nelle cellule nervose, la molecola CD26, un antigene dotato di attività enzimatica (dipeptidil-peptidasi) espresso in grandi quantità su linfociti T, monociti e piastrine, e le molecole HLA-DR.

In ogni caso, i linfociti T helper CD4⁺ ed altre cellule CD4⁺ rappresentano le principali popolazioni cellulari sensibili all'infezione da HIV. Non c'è dubbio che CD4 sia il *recettore fondamentale*, per il quale la glicoproteina gp120 presente nell'envelope virale (e che rappresenta l'*antirecettore* virale) mostra un'elevatissima "affinità", e con il quale gp120 interagisce formando un complesso molto stabile. In particolar modo, nel riconoscimento della cellula bersaglio risultano coinvolte alcune regioni conservate della glicoproteina di superficie gp120. In base alla variabilità genetica del gene *env*, la gp120 viene solitamente divisa in regioni conservate (C) e regioni variabili (V). All'interno della terza regione variabile esiste una regione ipervariabile (V3 *loop*) che costituisce uno dei principali epitopi verso cui gli anticorpi esplicano la loro azione neutralizzante.

La sensibilità all'infezione da HIV dipende, di norma, dalla contemporanea presenza sulla superficie cellulare, non solo di CD4, ma anche di uno, almeno, di una serie di possibili co-recettori rappresentati da diverse molecole transmembranarie (con sette domini transmembranari) che svolgono la funzione fisiologica di recettori di una serie di chemochine. In particolare, alla superficie dei macrofagi il co-recettore è rappresentato dalla molecola **CCR5** (recettore specifico per le chemochine RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β) e la sua presenza è essenziale per l'infettività degli stipiti *macrofagotropici*. Analoga funzione possono svolgere anche i recettori 2b (CCR2b) e CCR3 (specifico per la chemochina "eotaxin") che però hanno una espressione più ristretta: CCR3 è soprattutto espresso dagli eosinofili (che sono CD4⁺ e sono suscettibili all'infezione da HIV-1). Gli stipiti di HIV-1 *linfotropici*, invece, utilizzano come co-recettore la molecola di superficie già nota come LESTR (*Leukocyte Expressed-Seven Transmembrane-domain Receptor*) o "fusina" ed oggi denominata **CXCR4**.

L'infezione inizia con l'ancoraggio del virione alla membrana della cellula bersaglio. Questo processo ha origine con il legame della proteina pericapsidica Env (formata da tre copie ciascuna delle due subunità gp120 e gp41) con il recettore primario CD4 presente alla superficie cellulare. Il legame iniziale a CD4 provoca l'esposizione di un'altra porzione del trimero Env che, a sua volta, si lega a un co-recettore, usualmente rappresentato dal recettore CXCR4 nel caso degli stipiti linfotropici di HIV o dal recettore CCR5 nel caso degli stipiti macrofagotropici di HIV. Esiste anche un certo numero di stipiti *duotropici* in grado di infettare sia cellule

macrofagiche sia linfociti CD4+. La liberazione del nucleocapside virale nel citoplasma cellulare avviene generalmente per la fusione del peplio virale con la membrana cellulare esterna. Il legame al co-recettore causa l'esposizione e l'apertura della porzione distale del trimero della subunità gp41 che si inserisce nella membrana cellulare provocandone la fusione con il peplio virale e consentendo la penetrazione del contenuto del virione, rappresentato essenzialmente dalle molecole di RNA genomico e dalle varie proteine associate nel citoplasma cellulare (Fig. 4).

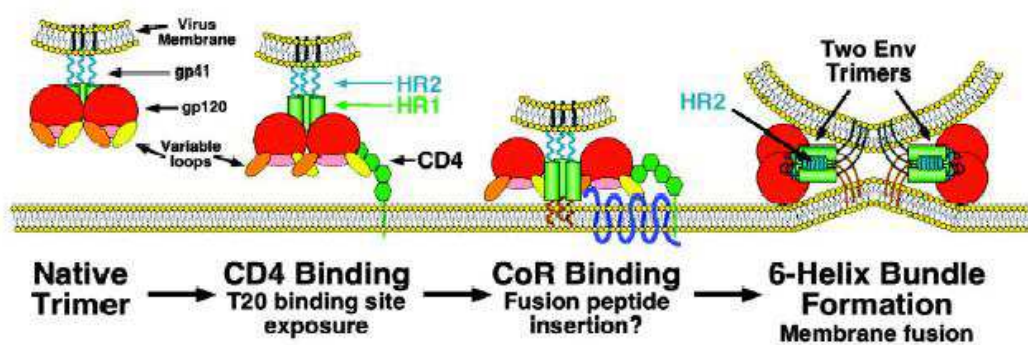


Figura 4 Ancoraggio e fusione del virione alla membrana della cellula bersaglio

A questo punto inizia la retrotrascrizione del genoma virale nel DNA corrispondente (cDNA) ed il trasferimento del complesso formato dal cDNA virale, probabilmente in forma circolarizzata, e da varie proteine virali e cellulari (*preintegration complex*) nel nucleo della cellula dove l'endonucleasi/integrasi virale consente l'inserzione del cDNA nel DNA cromosomico della cellula ospite. Una volta integrato, il DNA virale rimane permanentemente associato al genoma della cellula ospite, fino a che la cellula è in vita. Il DNA virale integrato o *provirus* può rimanere silente (infezione latente) per periodi anche molto lunghi prima di essere trascritto nei diversi RNA messaggeri e dare l'avvio ad un ciclo di replicazione virale (infezione produttiva). Il provirus di HIV presenta un proprio *promoter* (LTR 5') capace di legare numerosi fattori trascrizionali cellulari attivati, in grado a loro volta di consentire l'ancoraggio della trascrittasi cellulare (RNA-polimerasi II) e l'avvio del processo trascrittivo. All'inizio del processo trascrittivo gli RNA messaggeri virali che vengono esportati nel citoplasma sono di piccole dimensioni (*multi-spliced*) e corrispondono, in pratica, ai singoli geni che codificano le proteine regolatrici ed accessorie. In particolare, una

delle proteine regolatrici che deve essere codificata all'inizio del processo replicativo è costituita dalla proteina *Tat* che rientra nel nucleo ed è essenziale affinché il processo trascrittivo del provirus avvenga regolarmente. Anche la proteina *Rev* rientra nel nucleo, si lega agli RNA messaggeri virali e li protegge dall'azione degli spliceosomi nucleari, consentendo l'esportazione degli RNA messaggeri di maggiori dimensioni (bloccando, quindi, la sintesi delle proteine regolatrici) nel citoplasma. A questo punto, in parte vengono tradotti nelle poliproteine da cui prendono origine le diverse proteine strutturali ad opera della proteasi virus-specifica, ed in parte vanno a costituire il genoma dei virioni neoprodotti che si assemblano, acquisiscono l'involucro pericapsidico dalla zona di membrana con la quale ha interagito la proteina MA e nella quale sono inseriti i trimeri di gp41 e gp120, e si liberano infine nell'ambiente extracellulare per "gemmazione". Le particelle costituenti la progenie virale possono essere rilasciate attraverso una lenta gemmazione che non comporta il danneggiamento immediato della cellula ospite, oppure la gemmazione può coinvolgere tutta la membrana cellulare, causando così il danneggiamento irreversibile della cellula. Durante o subito dopo la gemmazione interviene la proteasi virale che catalizza la scissione e la maturazione dei precursori *gag* e *gag-pol*. Questo evento di maturazione causa un profondo cambiamento della struttura del virione ed è indispensabile all'acquisizione dell'infettività (Fig. 5).

Gli antigeni e la variabilità del genoma di HIV

Tutte le proteine, strutturali e non, che si producono nel corso della replicazione di HIV, sono antigeniche ed in grado di stimolare una risposta immune. Mentre alcune proteine, soprattutto strutturali, sono maggiormente rappresentate e la risposta immune nei loro confronti è costante appannaggio di tutti i soggetti infetti, la presenza di anticorpi contro le proteine enzimatiche, ed in particolare contro le proteine regolatrici ed accessorie, è presente solo in una percentuale variabile di soggetti. Le proteine strutturali più rilevanti, sotto il profilo antigenico, sono rappresentate dalla proteina che forma l'involucro del core virale (CA o p24) e da altre proteine, prodotti terminali della trascrizione del gene *gag* (MA o p17, ad esempio), dalle glicoproteine di superficie (gp41 e gp120), nonché dai relativi precursori (p55, gp160). Gli anticorpi dotati di potere neutralizzante sono, ovviamente, quelli diretti nei confronti dell'antirecettore virale (gp120), la cui

efficacia è però grandemente pregiudicata dalla notevole ipervariabilità genomica di HIV proprio a livello del gene *env* con la produzione di varianti (genotipiche/antigeniche) in numero notevole ed in grado di sfuggire all'azione degli anticorpi anti-gp120 preesistenti.

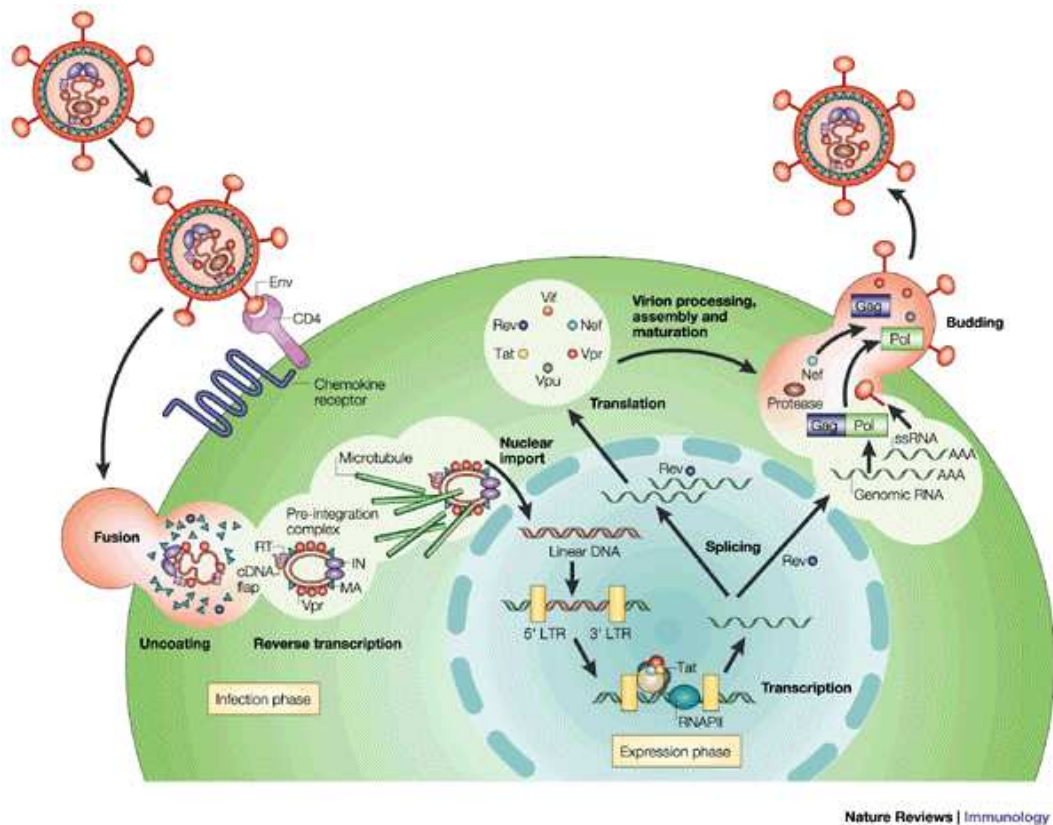


Figura 5 Ciclo replicativo di HIV

Una delle più evidenti caratteristiche del genoma di HIV-1 è rappresentata dal notevole grado di variabilità dimostrabile tra differenti stipiti virali isolati da diversi individui o, addirittura, tra gli stipiti virali isolati dallo stesso individuo in diversi momenti dell'infezione, e che appare molto più accentuata del grado di variabilità riscontrabile in altri virus con genoma ad RNA che è pure molto elevato. L'analisi delle sequenze nucleotidiche di differenti isolati virali, dimostra che la distribuzione delle sequenze variate tra i diversi stipiti, non è ugualmente distribuita in tutto il genoma provirale e che, in generale, le sequenze dei geni *env* e *nef* sono le più soggette a variazioni, mentre le sequenze dei geni *gag* e *pol* sono le più conservate.

Inoltre, mentre nei geni *gag* e *pol* la maggior parte delle mutazioni (da far risalire ad errori durante la trascrizione inversa) sono mutazioni puntiformi e per lo più localizzate nel terzo paio di basi del codon (e quindi per lo più silenti, ossia senza comportare la necessità di inserimento di un aminoacido diverso), nel gene *env* le variazioni comprendono più coppie di basi e sono rappresentate da delezioni “in frame⁴”, inserzioni e duplicazioni; non solo, ma se si tratta di mutazioni puntiformi esse sono frequentemente a livello della prima o seconda coppia di nucleotidi e quindi necessariamente non-silenti. Nel caso delle mutazioni che coinvolgono il gene *env*, sembra evidente che esista una pressione di selezione positiva in favore di modificazioni non-silenti delle glicoproteine di superficie come strumento per eludere la risposta immune dell’organismo. Nonostante l’elevata variabilità delle glicoproteine di superficie, esse contengono tuttavia alcune regioni altamente conservate e presumibilmente con una rilevante funzione biologica. Ad esempio, tutti i residui cisteinici di gp120 e gran parte di quelli di gp41 sono costanti nella quasi totalità dei virus esaminati, probabilmente per la funzione essenziale della cisteina nel mantenere un’adeguata configurazione tridimensionale delle proteine di superficie. Nella gp120 sono inoltre presenti almeno quattro sequenze aminoacidiche relativamente costanti (C1-C4) intercalate con regioni ipervariabili (V1-V5), una delle quali corrisponde al principale epitopo in grado di evocare la produzione di anticorpi neutralizzanti con la conseguenza che gli anticorpi neutralizzanti prodotti nei confronti di un virus sono poco o punto efficaci nei confronti di altri stipiti virali che si possono produrre nel corso di una infezione anche nello stesso individuo, il che rende quanto mai problematica la possibilità di indurre un’efficace immunizzazione attiva (vaccinazione) nei confronti degli antigeni virali di superficie. L’analisi delle sequenze nucleotidiche del genoma dei diversi stipiti di HIV-1 (e HIV-2) oltre che mettere in evidenza la notevole variabilità di alcuni tratti genomici (e la conseguente variabilità antigenica, più o meno spiccata, di alcune proteine virioniche) ha consentito di stabilire precisi rapporti evolutivi (filogenetici), da una parte, tra i diversi virus circolanti nella specie umana e, dall’altra, di evidenziare

⁴ Le *delezioni in frame* determinano l’eliminazione di una tripletta o di un numero di nucleotidi divisibili per tre con conseguente eliminazione di uno o più aminoacidi nella proteina codificata a partire dall’RNA messaggero maturo che le contiene. Si definiscono “in frame” poiché non spostano la cornice di lettura a livello ribosomiale: ciò comporterebbe il pressoché totale cambiamento della sequenza aminoacidica di una proteina.

attendibili rapporti evolutivi dei virus umani con alcuni lentivirus (che, per analogia, sono definiti *Simian Immunodeficiency Virus* o *SIV*, anche se nell'animale ospite naturale sembrano ben tollerati senza la comparsa di manifestazioni patologiche) presenti in almeno 26 specie di scimmie. Sembra ormai si possa considerare molto probabile che i retrovirus umani HIV-1 e HIV-2 abbiano avuto la loro origine in Africa, nella relativamente recente (primi decenni del secolo XX) trasmissione all'uomo, attraverso la inoculazione accidentale di sangue di scimmie infette durante la cattura o la macellazione a scopo alimentare, rispettivamente del *SIV_{chimpanzee}* o *SIV_{cpz}* dello scimpanzè e di *SIV_{sm}* presente nei cercopitechi.

Sulla base dei rapporti filogenetici evidenziati dallo studio delle sequenze genomiche, gli stipti di HIV-1 circolanti nella specie umana, sono classificabili in tre gruppi o classi principali: **M** (*main*), **N** (*new*) e **O** (*outlier*). Tra i virus del gruppo M, che sono responsabili di più del 90% delle infezioni in tutto il mondo, si possono distinguere nove sottogruppi o clades indicati con le lettere A-H e J, ed una serie di forme ricombinanti. Le variazioni nella sequenza aminoacidica delle proteine pericapsidiche tra un sottogruppo ed un altro possono essere superiori al 30%. Il sottogruppo B è quello più diffuso in Italia, nel resto dell'Europa occidentale e nel continente americano e differisce in modo consistente da quelli presenti in Asia ed in Africa dove si trova la maggior parte dei soggetti infetti, con una contemporanea presenza di sottogruppi diversi massima nei Paesi dell'Africa sub-Sahariana. A tutt'oggi, le tecniche diagnostiche e lo sviluppo di farmaci hanno avuto come oggetto i virus del sottogruppo B. Man mano che il trattamento delle infezioni da HIV viene esteso alle zone dove il sottogruppo B non predomina, emergono problemi di risposta virale ai farmaci, di differenti pattern di farmacoresistenza degli stipti virali e di affidabilità delle tecniche diagnostiche per il follow-up delle infezioni (monitoraggio della carica virale o *viral load*, test di resistenza degli stipti virali ai farmaci) di cui la ricerca dovrà ovviamente farsi carico. La differenza nelle sequenze aminoacidiche delle proteine pericapsidiche, inoltre, è un aspetto che dovrà essere considerato negli studi per lo sviluppo di eventuali vaccini antivirali, anche in considerazione del fatto che sia gli anticorpi neutralizzanti sia buona parte dei linfociti T citotossici agiscono in modo abbastanza sottogruppo-specifico.

Come già detto, il nostro Paese è interessato soprattutto dal virus del gruppo M di sottotipo B. Dato però il numero elevato di scambi di popolazione tra le varie zone

del globo, i reattivi sierologici utilizzati per la ricerca di anticorpi specifici sono disegnati in modo da poter rilevare la presenza di anticorpi anche nei confronti dei virus meno frequenti nelle nostre aree (ad esempio, la presenza di anticorpi nei confronti di circa il 20% dei virus del gruppo O – che formano circa il 10% degli stipiti di HIV-1 isolati in Camerun – non sarebbe rilevabile con reattivi antigenici ricavati da virus esclusivamente del gruppo M).

Evoluzione clinica dell'AIDS

L'infezione da HIV-1 rappresenta la tappa iniziale di un processo che, nella grande maggioranza dei casi (oltre il 90-95%) si traduce, anche se dopo un periodo di tempo piuttosto lungo (anni) di “relativa” latenza clinica, in un drammatico quadro patologico che si conclude invariabilmente con la morte del paziente. Non sono ancora del tutto chiari i motivi (al di là di una particolarmente intensa risposta dei linfociti T citotossici CD8, specifici per numerosi epitopi antigenici virali) che consentono a una piccola percentuale di soggetti (4-5%) infetti da HIV (molti dei quali da oltre 15 anni) di sopravvivere senza manifestazioni patologiche clinicamente evidenti e con un normale corredo di linfociti T CD4 circolanti (*long term non-progressors*).

L'infezione è sempre la conseguenza della trasmissione di sangue o di altri liquidi biologici (soprattutto se contenenti cellule mononucleate del sangue periferico) anche in tracce non avvertite, da un soggetto infetto ad un soggetto sano. HIV-1 è stato isolato, oltre che dal sangue, anche da sperma, secrezioni vaginali, liquido cefalorachidiano, latte e, in concentrazioni molto basse, dalla saliva e dal liquido lacrimale. Nei vari materiali biologici, HIV si può trovare sotto forma di virioni isolati o di virioni contenuti in cellule mononucleate del sangue periferico infette e queste ultime sembrano rappresentare le maggiori responsabili della trasmissione dell'infezione (il virus intracellulare è meno facilmente inattivabile al di fuori dell'organismo). La trasmissione si verifica generalmente attraverso rapporti sessuali non protetti (soprattutto se accompagnati da microtraumi come è frequente tra gli omosessuali di sesso maschile) e l'uso promiscuo di siringhe (tossicodipendenti, etc.). La trasmissione iatrogena, attraverso le trasfusioni di sangue o l'inoculazione di emoderivati ed i trapianti di organi o tessuti, è oggi praticamente azzerata per la selezione ed i controlli dei donatori, anche se non si può escludere completamente il

rischio (difficilmente quantificabile ma, comunque, almeno per quanto riguarda le trasfusioni di sangue, inferiore a 1 caso possibile su 1,4 – 1,8 milioni di unità di sangue) di un donatore che si trovi nel periodo tra l'infezione e la positivizzazione dei test sierologici (il cosiddetto “periodo finestra”). L'infezione può trasmettersi anche dalla madre infetta al feto per via diaplacentare, o dalla madre infetta al neonato per un'infezione perinatale durante il parto o il successivo allattamento. L'infezione da HIV rappresenta anche un rischio occupazionale per il personale sanitario che attende alla cura ed al trattamento di pazienti infetti.

L'**infezione primaria** comprende il periodo di tempo che va dal momento dell'infezione iniziale allo sviluppo di una reazione anticorpale evidenziabile con i test di routine (sierconversione). In circa l'80% degli individui infetti, dopo un periodo di 3-6 settimane, si manifesta clinicamente la cosiddetta **sindrome retrovirale acuta** con un corteo di sintomi che somigliano in qualche modo a quelli della mononucleosi infettiva (febbre, linfadenopatie, stanchezza, esantema maculopapulare fugace) che si esaurisce spontaneamente in un periodo di tempo variabile da una settimana a tre mesi (con una media di 14 giorni), senza sintomi patognomonicamente evidenti che possano far pensare ad un'infezione da HIV in assenza di precisi sospetti epidemiologici. Durante l'infezione primaria la viremia raggiunge spesso valori molto elevati, dell'ordine di milioni di copie di RNA virale/ml, che però declinano abbastanza rapidamente a dimostrazione che la risposta immune dell'organismo è in grado di stabilire un qualche tipo di controllo sull'infezione, almeno nel breve periodo. In particolare, durante l'infezione primaria i linfociti citotossici CD8 (CTL) specifici per HIV presentano una marcata espansione clonale con l'espressione di elevati livelli di marcatori di attivazione (CD38, HLA-DR) e l'ampiezza e l'intensità della risposta dei CTL è correlata direttamente con il grado di controllo dell'infezione virale (ed inversamente con la rapidità della progressione clinica). Il numero di linfociti T CD4 in genere diminuisce durante l'infezione primaria ed in qualche caso può raggiungere livelli sufficientemente bassi da consentire la comparsa di infezioni opportunistiche. Al termine dell'infezione primaria, il numero assoluto di linfociti T CD4 presenti nel sangue risale, ma senza mai ritornare ai livelli normali (circa 1000/ μ l nel soggetto normale). Subito dopo l'infezione acuta si stabilisce un relativo equilibrio tra la replicazione virale e la

risposta immune dell'ospite con la pressoché totale scomparsa di una viremia apprezzabile, ed il soggetto infetto entra nella cosiddetta fase di **infezione cronica** o di **latenza clinica** durante la quale non presenta segni patologici di rilievo attribuibili all'infezione da HIV. La fase di latenza clinica può durare molti anni (fino a 10 o più – in media 7 anni) anche in assenza di specifici trattamenti terapeutici. Nonostante la latenza clinica, durante la fase di infezione cronica la replicazione virale rimane attiva per la massiccia presenza di virus nei vari distretti di tessuto linfoide (linfonodi, tessuto linfoide associato alle mucose, etc.) e soprattutto nel tessuto linfoide associato alla mucosa intestinale o GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*) che sembra rappresenti uno dei principali, se non il principale, *reservoir* dell'infezione (Fig. 6).



Figura 6 Compartimenti di attiva replicazione e di latenza

Ciò dipenderebbe, almeno in parte, dal fatto che gp120 presenta una breve sequenza aminoacidica in grado di mimare il ligando specifico per l'integrina α -4/ β -7 o LPAM-1 (*Lymphocyte Peyer patch Adhesion Molecule*)⁵ innescando il *signaling* che porta all'attivazione dell'integrina LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-*

⁵ L'integrina α -4/ β -7 o LPAM-1 (*Lymphocyte Peyer patch Adhesion Molecule*) è presente alla superficie dei linfociti T4 attivati (cellule effettrici e/o di memoria). Il legame di LPAM-1 a MAdCAM-1 (*Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1*), una glicoproteina espressa dalle cellule endoteliali dell'intestino, contribuisce a condizionare il tropismo ed il posizionamento dei linfociti nel GALT.

I), la quale favorisce l'interazione fisica tra le cellule linfocitarie creando condizioni (sinapsi virologica) che facilitano enormemente la diffusione intercellulare di HIV. Nello stesso tempo la maggior parte dei soggetti infetti, anche se asintomatici, presentano un calo progressivo dei linfociti T CD4 nel circolo periferico (in media si osserva una perdita di 50-90 linfociti T CD4/ μ l/anno) con una progressiva accelerazione con il trascorrere del tempo. La velocità di progressione dell'infezione verso la malattia varia considerevolmente nei soggetti adulti (nei bambini infetti per infezione congenita o perinatale, invece, la progressione verso lo stadio di malattia conclamata è di norma piuttosto rapida) ed è in rapporto alla intensità del calo dei CD4 ed al livello della viremia (Fig. 7).

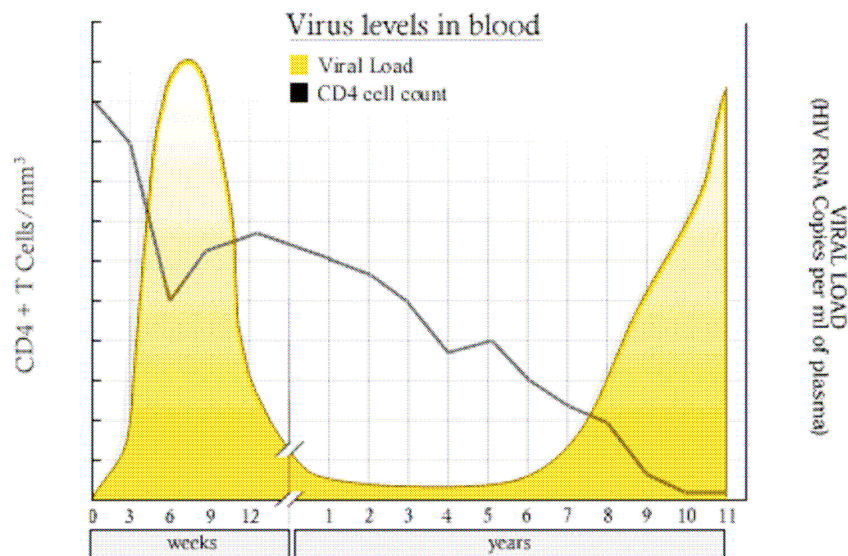


Figura 7 Andamento della carica virale e dei CD4+ nel corso delle diverse fasi della malattia

Sotto il profilo dell'**evoluzione clinica** dell'infezione, esistono diversi schemi classificativi delle varie fasi che dall'infezione primaria portano all'AIDS conclamato, ed i più seguiti sono quelli elaborati dal CDC (*Center for Disease Control and Prevention*, Atlanta, USA) e dall'OMS (*Organizzazione Mondiale della Sanità*). E' importante sottolineare che nelle varie classificazioni, l'evoluzione dell'infezione è distinta in diversi stadi soprattutto sulla base della progressiva diminuzione dei linfociti T CD4 e dell'altrettanto progressiva comparsa e, sovente,

all'accumulo di una serie di manifestazioni cliniche che sono rappresentate da (di seguito vengono elencate quelle osservate con maggiore frequenza):

linfadenopatia generalizzata (**stadio 1** della classificazione OMS); Herpes zoster, patologie mucocutanee (dermatite seborroica, ulcere ricorrenti nel cavo orale, esantemi papulari pruriginosi, onicomicosi) (**stadio 2**); perdita ponderale notevole, diarrea cronica, episodi febbrili persistenti, candidosi orale, episodi di tubercolosi polmonare attiva, infezioni batteriche ricorrenti (polmonite, meningite, piomiosite, infezioni osteo-articolari), stomatite ulcerosa necrotizzante, gengiviti, paradontiti, emocitopenie periferiche (anemia, neutropenia, trombocitopenia) (**stadio 3**), fino allo **stadio 4** o di **AIDS conclamato**^[4] (il cui inizio in genere coincide con il calo del numero di T CD4 al di sotto di 200/ μ l) in cui compaiono una serie di infezioni opportunistiche da microrganismi o virus poco o punto patogeni per i soggetti normali o, comunque, in sedi e con una frequenza ed un decorso non osservabili in soggetti normali (polmonite batterica ricorrente, candidiasi esofagea o tracheo-bronchiale e polmonare, criptococcosi extrapolmonare, criptosporidiosi intestinale cronica, isosporiasi intestinale cronica, istoplasmosi extrapolmonare o disseminata, infezioni disseminate o extrapolmonari da *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii* o da altri micobatteri non tubercolari, riattivazione e cronicizzazione di infezioni tubercolari polmonari ed extrapolmonari, polmonite da *Pneumocystis carinii*, toxoplasmosi cerebrale, setticemie ricorrenti da *Salmonella* spp., corioretinite citomegalica e malattia citomegalica diffusa, lesioni mucocutanee croniche e, occasionalmente, polmoniti o esofagiti da Herpes simplex), nonché una serie di manifestazioni neoplastiche (sarcoma di Kaposi, carcinoma cervicale invasivo, linfoma di Burkitt, linfoma immunoblastico o linfoma primario del sistema nervoso centrale) e, infine, la cosiddetta encefalopatia da HIV con ampie lesioni degenerative del sistema nervoso centrale che, in qualche caso, può iniziare precocemente durante l'infezione ed esprimersi con sintomi psichiatrici di rilievo (*AIDS-related dementia*). Come è ovvio, nonostante la disponibilità di farmaci antivirali di qualche efficacia e di farmaci antimicrobici teoricamente attivi sugli agenti eziologici delle varie infezioni opportunistiche, lo stadio di AIDS conclamato che si accompagna ad un sistema immune incapace ormai di una qualsiasi risposta efficace, è destinato a concludersi con la morte del paziente.

Fattori dell'organismo ospite e fattori virali hanno ruoli che si intrecciano nell'influenzare la progressione della malattia. I **fattori dell'organismo ospite** in grado di influenzare il decorso della patologia sono molteplici. I soggetti che acquisiscono l'infezione in età avanzata (così come i neonati che contraggono l'infezione dalla madre infetta) tendono ad avere una progressione più rapida e tempi più ridotti di sopravvivenza.

La presenza di mutazioni nei geni che codificano i co-recettori (soprattutto CCR5) necessari ad HIV per infettare le cellule CD4+, influenzano sia la suscettibilità all'infezione sia la progressione della patologia: un allele di CCR5 mutato con una delezione di 32 paia di basi (CCR5-Δ-32) è frequente nella popolazione europea con la conseguente produzione di una molecola di CCR5 troncata e non funzionale, che non viene trasportata sulla superficie cellulare. Il 10-15% dei soggetti di cosiddetta origine caucasica (Europa, bacino del Mediterraneo, Medio Oriente) sono eterozigoti e l'1% sono omozigoti. Quest'ultimi presentano una notevolissima (anche se non assoluta) resistenza all'infezione, mentre i soggetti eterozigoti sono normalmente suscettibili all'infezione ma con una maggiore tendenza a un più prolungato decorso del periodo asintomatico.

Anche alcune differenze genetiche negli alleli del sistema HLA (*Human Leukocyte Antigens*) che comprende, e nella pratica coincide, con il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC di classe I e II) possono influenzare il decorso dell'infezione da HIV e la progressione verso la malattia. Gli alleli B35 e Cw4 della classe I sembrano associati con una progressione accelerata della malattia^[5]. Infatti, poiché gli alleli di classe I sono quelli che condizionano quali (e quanti) diversi epitopi virali possono essere presentati ai linfociti T citotossici CD8, una notevole diversità (eterozigosi) negli alleli HLA in un individuo può offrire un'opzione più ampia a un'efficace immunità cellulo-mediata nei confronti di HIV. Al contrario, la presenza di HLA-B27 e B57 è stata associata con una progressione più lenta verso la malattia e, in particolare, HLA-B*57:01 si ritrova espresso a livelli particolarmente elevati nei soggetti "*long term non-progressors*"^[6,7]. Il continuo progresso nelle conoscenze e nelle ricerche nel campo della genomica e della proteomica è possibile dire, in un futuro non molto lontano, un più preciso dettaglio dei rapporti tra assetto genetico e resistenza (o suscettibilità) all'infezione da HIV, con possibili ricadute applicative sul piano terapeutico e profilattico.

Esistono anche **fattori virali** in grado di influenzare il decorso dell'infezione e la progressione verso la malattia. Come precedentemente già detto, i virioni di HIV infettano le cellule umane legandosi inizialmente al recettore CD4 presente alla superficie cellulare (la cui presenza, quindi, definisce e comprende i diversi *subset* di cellule sensibili) ma necessitano, subito dopo, del legame ad un co-recettore per avviare il processo di penetrazione intracellulare. Gli stipiti macrofagotropici infettano monociti e macrofagi usando preferibilmente il co-recettore CCR5 e producono un fenotipo virale che, in colture cellulari *in vitro* (colture di cellule mononucleate dal sangue periferico), non induce la formazione di sincizi; al contrario, gli stipiti T-linfotropici usano CXCR4 come co-recettore preferito e danno luogo ad una progenie virale con fenotipo sinciziogeno in colture di cellule. Esistono anche stipiti duotropici che possono usare indifferentemente i due co-recettori e possiedono, quindi, un più ampio spettro di cellule bersaglio. Gli stipiti macrofagotropici sono presenti frequentemente nella fase iniziale dell'infezione, mentre gli stipiti T-linfotropici finiscono con il prevalere nel corso della malattia, in associazione con la rapida deplezione del numero dei linfociti T CD4.

Un'altra caratteristica che condiziona la patogenicità dei diversi stipiti virali è espressa nel concetto di *fitness*, che indica la capacità di un'efficiente replicazione del virus in un determinato ambiente. La ipermutabilità di diverse zone del genoma virale, consente la comparsa di nuove sottopopolazioni con caratteristiche antigeniche di superficie che consentono di evadere, almeno in parte, la risposta immune dell'organismo conferendo al virus una maggiore *fitness* rispetto alla popolazione originale, in presenza di un'intensa risposta immune dell'organismo. Al contrario, i mutanti farmaco-resistenti che insorgono durante la terapia e che sono portatori di mutazioni nella trascrittasi inversa e nella proteasi possiedono spesso una *fitness* ridotta e, quindi, una minore capacità replicativa rispetto a quella presentata dagli stipiti selvaggi, ovviamente in assenza di terapia; anche se, in seguito al continuo accumulo nel tempo di mutazioni sotto la pressione selettiva operata dalla terapia, può prodursi la comparsa di varianti farmaco-resistenti con aumentata *fitness*, sia per una oramai totale resistenza all'azione dei farmaci, sia per la vera e propria ripresa di un'efficiente capacità replicativa.

Anche altri fattori virali possono avere influenza (sebbene non sempre ne è completamente chiaro il meccanismo che la sottintende) sul decorso dell'infezione.

Ad esempio, in Uganda è stata osservata una progressione dell'infezione molto più rapida negli individui infettati da HIV di sottotipo D rispetto a quella osservata nei soggetti infettati dal sottotipo A. Infine, in alcuni casi l'infezione con rare varianti di virus, in particolare quelli con un prodotto difettivo del gene *nef*, può produrre un'evoluzione particolarmente rallentata della patologia.

Patogenesi dell'AIDS

Sebbene esistano ancora numerosi aspetti che attendono un chiarimento completo, non vi è dubbio che i cardini su cui poggia la patogenesi della sindrome da immunodeficienza acquisita siano rappresentati da una prolungata ed eccessiva iperstimolazione della risposta immune umorale e cellulo-mediata, con una graduale disorganizzazione del network di segnali di regolazione e, soprattutto da una progressiva ed inesorabile diminuzione del numero di linfociti T CD4, che si concludono nel definitivo collasso della capacità di risposta immune dell'organismo. Come già detto, nella fase iniziale il soggetto infetto mostra una specifica risposta immune umorale (anticorpi) e cellulo-mediata (linfociti T CD8 citotossici) che fanno ambedue perno sulla produzione di una serie di citochine da parte degli specifici linfociti T helper CD4 attivati dal contatto con i relativi antigeni presentati nel contesto di molecole di MHC II. La risposta immune è in grado di controllare la viremia. Gli specifici linfociti T CD8, soprattutto, sono in grado di impedire la replicazione virale sia direttamente, riconoscendo ed uccidendo le cellule infette che presentano frammenti (epitopi) di proteine di HIV nel contesto di molecole di MHC I, sia indirettamente, producendo chemochine solubili con azione antivirale come RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β che, attraverso il blocco dei co-recettori, impediscono ad HIV di infettare altre cellule. La risposta immune umorale sembra meno efficace nel controllo della viremia e la presenza di anticorpi efficacemente neutralizzanti (che, almeno teoricamente, sono quelli specifici per l'antirecettore virale costituito dalla gp120) è relativamente scarsa, anche per l'ipermutabilità del relativo gene codificante. Ciononostante, HIV continua a replicarsi attivamente, "sequestrato" in una serie di organi linfoidei e relativamente al riparo dai principali effettori della risposta immune, con la produzione di una notevole quantità (fino a 10^9 - 10^{10} nuovi virioni al giorno) di particelle virali, molte delle quali presentano continue e nuove modificazioni antigeniche che sfuggono alla risposta immune innescata inizialmente

e provocano il continuo reclutamento nella attivazione immune di nuovi cloni di T CD4 e T CD8 (nei pazienti con infezione da HIV, oltre un quinto dei linfociti T CD8 circolanti, sono specifici per epitopi antigenici del virus). Tutto ciò, insieme alla concomitante progressiva intensificazione ed all'erronea regolazione nella produzione di specifiche chemochine solubili con conseguenze anche indirette di disturbo di diverse funzioni cellulari, rappresenterebbe la causa di innesco della *eccessiva attivazione* e della connessa sempre *minore efficienza* del sistema immunitario. L'eccessiva attivazione riguarda soprattutto il comparto della risposta immune umorale che sovente finisce per divenire tipicamente *policlonale*, mentre la minore efficienza attiene principalmente al comparto della risposta cellulo-mediata ed è dovuta a una crescente *anergia*, ovverosia incapacità a produrre le risposte alla base dei fenomeni di ipersensibilità ritardata che si traduce, ad esempio, nella negativizzazione della reazione cutanea alla tubercolina.

Per quanto riguarda il meccanismo alla base della progressiva e drammatica diminuzione del numero dei linfociti T CD4, la strategia evoluta dal virus che lo rende capace di infettare gli stessi linfociti T CD4, presenta alcune notevoli implicazioni e conseguenze. HIV infatti riesce ad integrare il proprio DNA provirale nel DNA cromosomico della cellula ospite, avviando quindi il ciclo di replicazione produttiva, esclusivamente nei T CD4 "attivati"⁶ da ciò deriva che proprio la popolazione di linfociti T CD4 HIV-specifici, attivamente ingaggiati nella risposta immune antivirale, è quella più esposta all'azione letale prodotta dall'infezione virale (con una selettiva deplezione, quindi, proprio della popolazione linfocitaria T CD4 virus-specifica). Non solo, ma poiché una quota dei linfociti T CD4 attivati ed infetti si ridifferenziano in cellule di memoria non più attivate, essi finiscono col formare un importante reservoir di cellule portatrici del genoma provirale integrato (infezione latente) dove il virus può persistere per tutto il periodo di vita delle cellule (la cui emivita è di molti anni) al riparo dagli effettori della risposta immune ed in una forma non attaccabile dai farmaci antivirali che agiscono solo in alcune fasi del ciclo di replicazione, il quale si verifica solo nell'infezione produttiva.

⁶ Il DNA provirale di HIV può essere presente anche in T CD4 non attivati in forma simil-episomica non integrata ed integrarsi se l'attivazione cellulare si verifica successivamente (purché nel giro di pochi giorni).

La deplezione del numero dei linfociti T CD4 è uno degli elementi fondamentali (il principale forse) della patogenesi dell'AIDS, in grado di misurare il rischio della comparsa di infezioni opportunistiche e delle altre complicanze patologiche che connotano gli stadi più avanzati della patologia. Sia un'aumentata distruzione periferica dei T CD4, sia una diminuita produzione di nuovi linfociti T CD4, giocano un ruolo nel declino inesorabile del loro numero nell'organismo. Sui meccanismi alla base della distruzione periferica dei linfociti T CD4, il primo ad essere preso in considerazione è stato quello della uccisione diretta dei linfociti T CD4 operata dall'infezione virale, in base al comportamento degli stipiti virali T-linfotropici in colture di cellule *in vitro*, dove l'attività di "cell killing" è sostanzialmente (anche se non esclusivamente) esplicata attraverso l'induzione della fusione cellulare in sincizi. Tuttavia, considerato che i differenti stipiti T-linfotropici di HIV possono variare consistentemente nella capacità sinciziogena e che alcune ricerche sembravano indicare come solo il 20-30% della popolazione totale dei linfociti T CD4 risultasse infetto, non era facile comprendere il meccanismo alla base della pressoché totale distruzione della relativa popolazione cellulare, anche in considerazione del fatto che, in condizioni fisiologiche, gli stessi linfociti sono continuamente rimpiazzati dalla proliferazione e dalla successiva differenziazione dei progenitori della filiera linfoide. E' stato recentemente dimostrato che nel corso dell'infezione da HIV, almeno il 50% dei linfociti T CD4 dell'organismo possono essere infetti, il che ha portato a considerare il ruolo del "cell killing" operato dal virus non solo come conseguenza diretta ed esclusiva dell'infezione cellulare produttiva, ma anche per l'induzione, nei linfociti T CD4 non infetti, del processo di morte cellulare programmata o apoptosi e dei connessi fenomeni di autofagia, che sembra vengano innescati da segnali indotti dal legame della glicoproteina gp120 soprattutto con il co-recettore CXCR4, con la conseguenza che la distruzione dei linfociti T CD4 coinvolge anche una quota sempre crescente della popolazione cellulare ben al di là della mera porzione di cellule direttamente infettate dal virus^[8]. Alla massiccia distruzione periferica, si associa anche una diminuita produzione di nuovi linfociti la cui patogenesi è da far risalire ad una consistente diminuzione della capacità di sopravvivenza, replicazione e differenziamento dei progenitori della filiera linfoide che, pur non presentando segni di infezione da HIV, sono danneggiati in modo irreversibile e, sovente, coinvolti nei processi di apoptosi ad opera di prodotti virus-

specifici, eliminati da cellule accessorie infette presenti nel sangue periferico e nello stroma del midollo osseo. Un analogo meccanismo, del resto, sembra sottintendere la patogenesi della “encefalopatia da HIV” caratterizzata da una massiccia distruzione di neuroni, i quali pur non essendo direttamente infettati dal virus sono definitivamente danneggiati da prodotti virus-specifici liberati dalle cellule accessorie presenti nel tessuto di sostegno, che HIV è in grado di infettare (macrofagi, microglia e, con minore efficienza, astrociti).

La diagnosi di infezione da HIV

L'infezione da HIV, una volta verificatasi, si mantiene costantemente “attiva” quindi per effettuare una diagnosi di infezione in atto (anche se clinicamente silente) è sufficiente rilevare la presenza anticorpale specifica per il virus nel siero di un individuo (*sieropositività*), senza dover ricercare l'agente patogeno.

Lo schema generale del protocollo diagnostico prevede dapprima il test per lo screening di base, costituito dalla ricerca di anticorpi anti-HIV nel siero mediante saggio immunoenzimatico *ELISA*, in cui gli antigeni virali (lisato virale, peptidi ricombinanti gag ed env e/o peptidi sintetici codificati dal gene env) sono adesi su fase solida⁷. Attualmente sono disponibili saggi *ELISA* di quarta generazione che combinano la ricerca degli antigeni virali a quella degli anticorpi, riducendo così il “periodo finestra”.

Gli anticorpi specifici per HIV possono essere rilevati entro 2-8 settimane dopo l'infezione. Il tempo necessario per osservare la **sieroconversione** dipende da diversi fattori, come la concentrazione infettante, la modalità di trasmissione e, infine, la sensibilità del test usato. La sieroconversione inizia generalmente con la comparsa di IgM specifiche per la proteina Gag, poi, nell'arco di 5-7 giorni, compaiono le IgG dirette verso le proteine virali p24 e gp120, che però in questa fase sono difficilmente individuabili con i comuni saggi sierologici. Il titolo anticorpale delle IgG specifiche per le proteine di HIV aumenta progressivamente nei primi mesi, per poi stabilizzarsi raggiungendo un plateau.

⁷ La *ricerca di anticorpi* si esegue routinariamente mediante reazioni immunoenzimatiche nei confronti di mescolanze di antigeni “ricombinanti” e/o di peptidi sintetici che riproducono gli epitopi antigenici più significativi delle principali proteine strutturali dei virus HIV-1 e 2 (e dei diversi sottotipi di HIV-1).

Campioni positivi o indeterminati con il test immunoenzimatico ELISA vengono quindi sottoposti ad un test qualitativo di secondo livello, cioè *Immunoblotting* o *Western blotting*, che consente di evidenziare la presenza di anticorpi contro le singole proteine virus-specifiche separate in base al peso molecolare. Per essere considerato positivo a questo test, un campione di siero deve possedere anticorpi verso almeno una proteina del core (p24) ed una dell'envelope (gp41, gp120 o gp160). Nei casi di reattività verso una sola proteina virale si ha un risultato indeterminato e perciò serve un secondo controllo dopo 15-30 giorni.

Pur consentendo, di norma, una sicura diagnosi di infezione, la ricerca di anticorpi presenta limiti di utilizzo in almeno tre circostanze: 1) nella fase iniziale dell'infezione ("periodo finestra" di 3-4 settimane), poiché la quantità degli anticorpi circolanti non è ancora sufficiente ad essere evidenziata dalle tecniche sierologiche; 2) nei neonati da madri infette, i quali possiedono anticorpi sierici anti-HIV di origine materna (IgG) di nessun valore diagnostico; 3) in quella percentuale (generalmente modesta) di soggetti infetti che dalle indagini sierologiche risultano "*borderline*", ovvero i cui risultati sono di dubbia positività e che propongono una difficile interpretazione.

Quando sia necessario accertare la presenza di infezione in situazioni in cui non sia possibile fare affidamento sulle indagini sierologiche o, comunque, in presenza di risultati dubbi di queste ultime, è necessario ricorrere alla ricerca del virus (in forma attiva o latente). Questa ricerca può essere effettuata mediante l'*isolamento del virus in coltura* allestendo co-culture di cellule mononucleate del sangue periferico del soggetto in esame con cellule mononucleate del sangue periferico di donatori normali, in presenza di idonei fattori in grado di stimolare l'attivazione cellulare, e monitorando periodicamente la comparsa di antigeni virus-specifici (in genere si usa il dosaggio della p24) nel sovrantante delle colture. Si tratta però di una tecnica relativamente indaginosa, che richiede tempi piuttosto lunghi e laboratori particolarmente attrezzati. Di norma, quindi, la ricerca della presenza del virus (nel sangue periferico) viene eseguita mediante la *rilevazione della presenza di antigeni specifici* (proteina p24 del "core" virale) e/o la ricerca di *specifiche sequenze nucleotidiche* (DNA provirale nei linfomonociti circolanti ed RNA virionico nel plasma). La ricerca di p24 e dell'RNA virale nel plasma assicurano un'elevata sensibilità nella diagnosi, ma per essere certi di un'infezione in atto, la ricerca del

DNA provirale nei linfomonociti circolanti attraverso metodiche di amplificazione quali la PCR, è in assoluto la metodica che dà maggior affidabilità rilevando la presenza di virus “latente” nella cellula (provirus) indipendentemente dalla replicazione virale e permettendo di ottenere una diagnosi in tempi più rapidi, senza dover manipolare virus infettante. Inoltre la DNA-PCR, che misura la quantità di virus “latente”, dà un’indicazione dell’ampiezza del *reservoir* di virus presente nell’organismo non sempre e non necessariamente correlata alla intensità della replicazione virale produttiva.

Questa metodica risulta utile anche nei casi di bambini nati da madre sieropositiva, nei quali per esempio è indispensabile distinguere tra gli anticorpi autoctoni ed IgG di origine materna, che possono persistere per 6-24 mesi e che perciò rendono impossibile l’uso dei test sierologici in bimbi di età inferiore ai 18 mesi. Per questi soggetti vengono perciò eseguiti test virologici utilizzando la PCR. Nel primo mese di vita possono esserci dei falsi positivi, ma comunque già alla nascita un 38% dei bambini infetti risultano positivi alla PCR e la sensibilità della metodica aumenta, fino a raggiungere il 100% in 14-30 giorni.

Nel **follow-up del paziente** è, invece, essenziale stabilire il livello di replicazione virale misurando la quantità di virus presente in circolo (il cosiddetto “*viral load*” o “carica virale”) per un corretto monitoraggio dell’andamento dell’infezione e dell’efficacia della terapia antivirale. La carica virale o “*viral load*”, che stima quindi la quantità di virioni presenti nel sangue circolante (numero di copie di HIV-1 RNA/ml di plasma) offre perciò una misura diretta dell’attività replicativa del virus e rappresenta un importante marker prognostico da considerare, insieme al numero di linfociti T CD4 ed all’eventuale presenza di infezione sintomatica, per la scelta della terapia farmacologica da intraprendere ed il suo monitoraggio nel tempo^[9]. Nell’infezione primaria dell’adulto il numero di copie di RNA virale raggiunge in breve tempo un picco elevato, per poi calare fino a stabilizzarsi dopo circa 6-12 mesi dal contagio, una volta che il sistema immunitario è riuscito ad arginare la replicazione virale. Al contrario, nei bambini infetti la “*viral load*”, bassa alla nascita, aumenta fino a raggiungere un picco intorno ai 2 mesi di vita, per poi diminuire molto lentamente.

Un altro aspetto molto importante da considerare è la correlazione tra livelli di RNA virale nel plasma e l’andamento della malattia, infatti il numero di copie di RNA nei

pazienti con infezione sintomatica è di molto superiore rispetto a quello rilevabile in soggetti asintomatici. Inoltre, i pazienti con alta carica virale e basso numero di linfociti T CD4 presentano un rischio maggiore di rapida progressione (pochi anni) verso la fase di AIDS conclamato. Pazienti con carica virale >100.000 copie/ml entro 6 mesi dalla sierconversione hanno una probabilità 10 volte maggiore di sviluppare la malattia nei 5 anni seguenti.

Diverse sono le metodiche utilizzate per questo tipo di analisi, alcune si basano sull'amplificazione della sequenza target (RT-PCR, NASBA), altre sull'amplificazione del segnale (b-DNA).

La terapia farmacologica

Fino a qualche tempo fa l'intervento medico nella terapia dell'infezione da HIV-1 si limitava al controllo ed alla cura delle infezioni opportunistiche che insorgono come conseguenza della malattia. Negli ultimi anni sono stati fatti enormi passi avanti e questo tipo di trattamento è stato completamente sostituito dall'introduzione di farmaci antiretrovirali.

La miglior comprensione della patogenesi dei danni prodotti dal virus, la possibilità di determinare la carica virale e di avere perciò un parametro diretto dell'effettiva replicazione virale e la disponibilità di nuovi farmaci a potente attività antiretrovirale, ha spostato l'attenzione medica da un ambito di tipo "curativo" verso la ricerca di combinazioni terapeutiche a scopo "preventivo", il più possibile efficaci ed al tempo stesso tollerabili dal paziente. Oggi perciò lo scopo primario della terapia è abbassare la carica virale quando il sistema immunitario è ancora efficiente e quindi in grado di recuperare pienamente le sue funzioni.

Poiché il virus dipende per la sua replicazione dal macchinario biologico della cellula ospite, i farmaci antiretrovirali devono inibire selettivamente la replicazione virale senza danneggiare il metabolismo cellulare. Gli studi di virologia molecolare hanno permesso di identificare funzioni virali specifiche: l'attacco del virus alla cellula target, la trascrizione inversa del genoma virale, la traduzione delle proteine e successivo assemblaggio e maturazione della progenie virale, l'inserzione del DNA provirale nel DNA cromosomico della cellula ospite, che possono servire da veri bersagli per l'inibizione.

Tutti questi farmaci non sono in grado di uccidere il virus, ma solo di bloccarne la replicazione, perciò i pazienti in trattamento, anche se hanno una carica virale non rilevabile nel sangue, devono comunque considerarsi sempre potenzialmente infettanti. Qualsiasi decisione sull'inizio o il cambiamento di terapia dovrebbe essere guidata dal continuo monitoraggio di parametri quali la carica virale ed il numero di linfociti T CD4.

Attualmente sono registrati in Italia farmaci antiretrovirali appartenenti alle seguenti classi farmacologiche, ognuna con un diverso meccanismo d'azione.

Analoghi Nucleosidici/Nucleotidici della Trascrittasi Inversa (NRTI): i più noti sono la *zidovudina* (AZT), la *didanosina* (DDI), la *zalcitabina* (DDC), la *lamivudina* (3TC), la *stavudina* (D4T) e l'*abacavir* (ABC). Nei primi dieci anni dalla scoperta del virus, questi farmaci sono stati i più usati in terapia. Sono detti nucleosidici per la loro somiglianza strutturale con i nucleosidi trifosfato. Agiscono nelle fasi precoci della replicazione per prevenire l'infezione delle cellule sane: dopo il loro ingresso nella cellula, questi farmaci vengono fosforilati dalle chinasi cellulari e sono così convertiti nella forma trifosfato attiva, che compete con il deossinucleotide naturale per il legame alla trascrittasi inversa. Inoltre, competono anche con i dideossinucleotidi trifosfato per l'incorporazione nella nuova catena nascente di DNA, bloccandone in tal modo la sintesi ulteriore (sono terminatori di catena poiché manca loro l'ossidrile in posizione 3') o alterandone la funzione. Sicuramente il farmaco più studiato è la zidovudina, utilizzato sin dal 1987. E' l'unico in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e perciò di prevenire le manifestazioni neurologiche dell'ADC (*AIDS-Dementia Complex*) e di prevenire il passaggio da madre a figlio durante la gravidanza.

Analoghi Non-Nucleosidici della Trascrittasi Inversa (NNRTI): questa classe di farmaci fu scoperta circa 20 anni fa, ma il loro sviluppo è stato ostacolato dagli scarsi risultati ottenuti in seguito all'impiego in monoterapia, per la rapida insorgenza di resistenza. I più noti sono la *nevirapina*, la *delavirdina*, l'*efavirenz*. Questi farmaci sono inibitori non competitivi, altamente selettivi per la trascrittasi inversa. Per essere attivati non richiedono la fosforilazione e non competono con i nucleosidi trifosfato, dei quali infatti non imitano la struttura. Il meccanismo con cui riescono a bloccare la trascrittasi è di tipo allosterico: agiscono legandosi direttamente al sito attivo dell'enzima, bloccandone l'azione ed impedendo così che avvenga la

formazione di DNA provirale. Hanno il vantaggio di essere privi di effetti sulle cellule ematopoietiche e di non mostrare resistenza crociata con gli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa.

Inibitori della Proteasi (IP): a differenza delle classi precedenti che lavorano in una fase precoce del ciclo replicativo, questi farmaci inibiscono la proteasi virale che è indispensabile in uno stadio tardivo del ciclo per scindere i precursori proteici in proteine virali mature. Questi farmaci sono composti a basso peso molecolare che interagiscono stericamente col sito attivo dell'enzima, situato all'interfaccia delle due sub-unità identiche che lo compongono, e sono tutti composti altamente idrofobici proprio per poter interagire con il sito catalitico della proteasi, inibendone reversibilmente l'attività. Poiché l'azione enzimatica della proteasi si esplica attraverso il processamento dei precursori della retrotrascrittasi, della integrasi e della proteina Gag e che solo le forme processate di queste proteine sono utilizzate per la costruzione di particelle virali infettanti, si deduce che questi farmaci determinano la produzione di particelle virioniche difettive, incapaci di infettare nuove cellule. Fanno parte degli inibitori della proteasi il *lopinavir*, il *darunavir*, l'*atazanavir*, il *fosamprenavir* ed il *tipranavir*.

Gli **inibitori della fusione**, invece, intervengono impedendo l'ingresso del retrovirus nella cellula, andando ad agire nella fase in cui HIV si lega alla cellula che andrà ad infettare. A questa categoria di farmaci appartiene T-20 (*enfuvirtide*), un peptide di sintesi derivato dalla proteina virale transmembrana gp41. Esso è in grado di legarsi alla glicoproteina gp41, impedendone il legame del virus con la cellula bersaglio e quindi bloccandone l'ingresso.

Recentemente sono stati messi a punto nuovi farmaci che agiscono sull'enzima endonucleasi/integrasi (**inibitori della integrasi**). L'integrasi di HIV è un enzima che ha il ruolo di favorire l'integrazione del DNA virale nella cellula ospite attraverso due passaggi caratterizzati dalla rottura del DNA virale (*3'-processing*) e dalla sua integrazione nella cellula ospite (*strand-transfer*). Gli inibitori inibiscono il passaggio strand-transfer, interagendo con cationi bivalenti del nucleo catalitico dell'enzima. A questa categoria appartengono il *raltegravir*, il *dolutegravir*, l'*elvitegravir* ed il *cobicistat*.

Infine, il *maraviroc* appartiene alla classe terapeutica denominata **antagonisti del co-recettore CCR5**: questi farmaci sono in grado di legarsi e bloccare il co-recettore

CCR5 impedendo l'infezione da parte degli stipiti macrofagotropici che predominano nella fase iniziale dell'infezione^[10].

Fallimento terapeutico e controllo dell'AIDS

Ogni farmaco porta alla selezione di mutanti virali resistenti e ciò è la causa principale dell'insuccesso terapeutico e l'ostacolo maggiore all'impiego del composto per trattamenti protratti dell'affezione nel lungo periodo. Poiché le mutazioni compaiono durante la replicazione, la loro insorgenza è la diretta conseguenza di un'incompleta soppressione dell'attività virale che si verifica o per una scorretta assunzione del farmaco o per inadeguatezza della terapia stessa. Per ridurre il rischio dell'insorgere di resistenze è necessario ottimizzare l'aderenza del paziente alla terapia ed utilizzare più farmaci in combinazione tra loro, ma è comunque documentato un fallimento terapeutico, nel primo anno di cura, nel 50% dei pazienti che iniziano la terapia antiretrovirale^[11].

L'uso di cocktail di farmaci, di solito due analoghi dei nucleosidici e non nucleosidici ed un inibitore della proteasi (regime HAART – *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*), oltre a rallentare lo sviluppo di farmacoresistenza, sembra in grado di ridurre la tossicità cronica del farmaco, poiché permette di ottenere lo stesso effetto con dosaggi inferiori dello stesso. Per ritardare l'insorgenza di mutazioni ci si basa sul fatto che in presenza di due farmaci la frequenza mutazionale per ciascuno non varia, ma diminuisce in modo esponenziale la possibilità di selezionare varianti con mutazioni resistenti per entrambi. Se un farmaco non è abbastanza potente o se è assunto in concentrazione troppo bassa, il ceppo selvaggio del virus resta prevalente nell'organismo e la carica virale elevata, senza comparsa di ceppi resistenti.

Molto importante è anche l'aderenza del paziente alla terapia; attualmente si ricorre a diverse assunzioni giornaliere con un preciso schema di somministrazione. I farmaci hanno numerosi effetti collaterali quali eritema, cefalea, nausea, anemia, insensibilità agli arti inferiori etc., che spesso portano ad un'interruzione del trattamento, indipendentemente dai benefici clinici ottenuti.

Gli interventi terapeutici oggi possibili pur con il loro valido effetto sulla riduzione della replicazione virale e sul recupero quantitativo, almeno temporaneo, della popolazione cellulare di T CD4, non hanno in prospettiva una possibilità di guarire l'infezione, dato che il virus sopravvive in forma provirale nei linfociti T CD4 di

memoria presenti in numerosi reservoir, dove è mantenuto per anni e dove la replicazione virale continua (probabilmente a livelli modesti) spesso anche al riparo dall'azione dei farmaci, per problemi connessi alla farmacocinetica delle molecole attive sulla replicazione di HIV.

Le ricerche per lo sviluppo di un **vaccino** profilattico efficace continuano in numerosi laboratori, ma la complessa biologia del virus ed il fatto che la risposta immune dell'organismo non riesca ad eradicare l'infezione in nessun soggetto infetto, rendono estremamente aleatorio il risultato prevedibile.

Per tutti questi motivi, il controllo dell'infezione è soprattutto affidato a **misure preventive generali**, come lo *screening* dei donatori (di sangue, organi o tessuti), il controllo del sangue e degli emoderivati, l'educazione sessuale, etc., alcune delle quali però trovano scarsa rispondenza in comunità con peculiari attitudini culturali (tossicodipendenti, prostitute, clienti di prostitute, etc.).

Il complesso maggiore di istocompatibilità

Il *complesso maggiore di istocompatibilità*, che nell'uomo è denominato *HLA* (*Human Leukocyte Antigen*), occupa circa 4×10^6 basi e contiene all'incirca 50 geni. I geni che codificano per la catena α delle molecole MHC di classe I e le catene α e β di quelle di classe II sono associati all'interno del complesso posto sul cromosoma 6. Il gene che codifica per la β_2 -microglobulina è localizzato, invece, sul cromosoma 15.

Regioni distinte contengono i geni che controllano la sintesi delle molecole di classe I e quelli di classe II ed all'interno di queste regioni sono contenuti numerosi geni che codificano per ciascuna catena. Nell'uomo vi sono tre geni per la catena α delle molecole di classe I, denominati HLA-A, -B e -C. Vi sono anche tre geni per le catene α e β delle molecole di classe II, denominati HLA-DR, -DP e -DQ. Il locus HLA-DR contiene un gene in più che può codificare per una catena β che si associa alla catena α codificata dal locus HLA-DR. Questo significa che i tre loci genici codificano per quattro diverse molecole MHC di classe II. Tutte le molecole MHC di classe I e II sono capaci di presentare l'antigene alle cellule T. Poiché ciascuna molecola può legare numerosi peptidi, la presenza di molti loci genici comporta che in ciascun individuo la gamma di peptidi che possono essere presentati è più vasta di quanto possa permettere la presenza di una sola molecola MHC.

I due geni TAP⁸ sono contenuti all'interno della regione genica che codifica le molecole di classe II e sono molto vicini ai due geni denominati LMP e che codificano per alcune proteine di basso peso molecolare che compongono il proteosoma (Fig. 8).

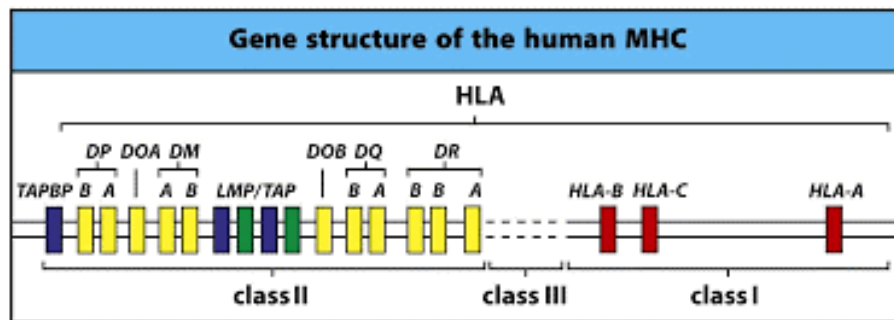


Figura 8 Organizzazione genetica del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA)

La stretta vicinanza dei geni delle proteine del complesso MHC deputate al trasporto dei peptidi con quelli che codificano per le proteine TAP e quelle dei proteosomi, deputate alla generazione ed al trasporto dei peptidi nel reticolo endoplasmatico, suggerisce che l'intero complesso MHC si sia evoluto per il compito di processare e presentare l'antigene.

Inoltre, le cellule in presenza di interferon- γ (INF- γ) aumentano la trascrizione dei geni per la catena α delle molecole MHC di classe I, la β_2 -microglobulina, le proteine del proteosoma e le proteine TAP. La citochina IFN- γ è prodotta durante le fasi precoci dell'infezione virale da componenti dell'immunità innata ed il suo effetto di aumentare la processazione e la presentazione dei peptidi, derivati dalle proteine virali, induce l'attivazione dei linfociti T specifici per l'antigene ed innesca la risposta immunitaria acquisita. La regolazione coordinata dei geni che codificano per questi componenti sembra essere facilitata dalla loro vicinanza all'interno del complesso MHC.

Poiché vi sono tre diversi geni che codificano le molecole di classe I e quattro per quelle di classe II, ogni individuo esprimerà almeno tre molecole di classe I e quattro

⁸ I geni TAP codificano per proteine chiamate Trasportatori 1 e 2 associati con la processazione dell'antigene (TAP-1 e TAP-2).

di classe II. In realtà, il numero di molecole espresse sulle cellule della maggior parte degli individui è molto più alto a causa dell'elevato **polimorfismo** del sistema. Il termine polimorfismo viene usato per intendere la variazione del singolo gene e del suo prodotto all'interno di una specie, e le varianti del gene all'interno della specie sono chiamate *alleli*. In alcuni loci dei geni di classe I e II vi sono più di 70 alleli e ciascun allele è presente nella popolazione con una frequenza variabile. Per questa ragione la probabilità che i geni per un determinato locus MHC siano uguali su i due filamenti cromosomici (alleli) è bassa. Quindi la maggior parte degli individui sono eterozigoti per i loci MHC. I prodotti di entrambi gli alleli sono espressi ed entrambe le molecole partecipano alla presentazione degli antigeni, quindi i geni sono *co-dominanti*. Il grande polimorfismo di ciascun locus potenzialmente raddoppia il numero di molecole MHC espresse su ciascuna cellula e quindi aumenta la variabilità ascrivibile al solo poligenismo. Ormai si conoscono centinaia di varianti alleliche ed a ciascuna di esse è stato assegnato un numero identificativo (ad esempio, HLA-B*27). Gli alleli simili sono stati catalogati insieme: nel caso di HLA-B*27, almeno 28 alleli molto simili sono considerati sottotipi mutanti. Questi sottotipi sono indicati con la dicitura da HLA-B*27:01 ad HLA-B*27:28.

Le molecole MHC di classe I e II sono glicoproteine di membrana strettamente imparentate in termini di struttura e funzione anche se sono composte da sub-unità diverse.

La molecola di classe I è composta da due catene polipeptidiche: una denominata catena α , o pesante, è codificata dai geni del complesso MHC, mentre la seconda più piccola è legata alla prima con legami non-covalenti ed è la β_2 -microglobulina, non codificata dai geni del complesso MHC. Solo la catena α è una proteina di transmembrana. Il dimero possiede quattro domini, tre appartengono alla catena α ed uno alla β_2 -microglobulina. Il dominio α_3 e la β_2 -microglobulina presentano una struttura ripiegata che ricorda quella di alcuni domini delle immunoglobuline. I domini α_1 e α_2 presentano una struttura più caratteristica ed insieme formano una piccola tasca sulla molecola che costituisce il sito di legame per il peptide, il quale è presentato ad una cellula T CD8 (Fig. 9).

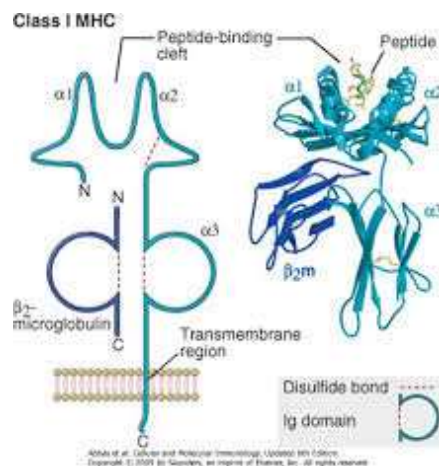


Figura 9 Struttura delle molecole MHC di classe I

Le molecole MHC di classe II sono costituite da un complesso molecolare formato da due catene α e due catene β , unite da legami non-covalenti (entrambe le catene attraversano la membrana cellulare). Le molecole MHC di classe II possiedono un ripiegamento simile a quello delle molecole di classe I, e presentano l'antigene a cellule T CD4. Le differenze maggiori nella parte ripiegata delle molecole risiede nella porzione terminale della tasca; la conseguenza più importante è che la parte terminale del peptide che lega la molecola di classe I è nascosta, mentre quella del peptide che lega la molecola MHC di classe II è esposta.

Farmacogenetica

La possibilità di predire la risposta farmacologica di un paziente sulla base del corredo genetico dell'individuo stesso è il concetto base della *farmacogenetica*, nota comunemente anche con il termine di medicina personalizzata. Per farmacogenetica si intende, infatti, lo “studio delle variazioni nelle caratteristiche del DNA in relazione alla risposta ai farmaci”^[12]. Lo sviluppo di questa branca della farmacologia generale è derivato innanzitutto dalla notevole quantità di informazioni riguardanti il genoma umano divenute accessibili all'intera comunità scientifica al completamento del Progetto Genoma Umano. Grazie agli sviluppi in campo bioinformatico è stato poi possibile organizzare, elaborare e catalogare l'immensa quantità di dati derivanti dal sequenziamento del genoma umano in database ed in tools bioinformatici di facile utilizzo, cosa che ha contribuito a rendere queste

informazioni molto più fruibili. In ultima istanza ciò che ha reso veramente possibile l'affermarsi della medicina personalizzata è stato lo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche, altamente sensibili, specifiche e poco costose, in grado di analizzare in tempi brevi milioni di polimorfismi (STRs, *short tandem repeats*; SNPs, *single nucleotide polymorphism*; CNV, *copy number variations*) collegati alla suscettibilità ad una certa malattia (ad esempio alzheimer o schizofrenia) piuttosto che al profilo individuale di risposta ad un farmaco (geni coinvolti nell'assorbimento, nel metabolismo e nell'escrezione di una sostanza). L'FDA (*Food and Drug Administration*) ha redatto ed aggiorna trimestralmente un elenco dei "*valid genomic biomarkers in the context of approved drug label*" cioè dei biomarcatori genomici ritenuti validi ai fini delle informazioni per l'uso dei farmaci⁹.

In Europa il primo test farmacogenetico ufficialmente riconosciuto valido ai fini delle informazioni per l'uso di un farmaco è lo *screening per l'allele HLA-B*57:01* per il farmaco *abacavir* nel trattamento dell'infezione da HIV.

La portata del cambiamento che la farmacogenetica può indurre nella terapia è davvero ampia dato che per nessun farmaco può essere esclusa a priori l'influenza, più o meno marcata, di fattori genetici sulla sua efficacia e sulla sicurezza individuale. Questo è valido soprattutto per quei farmaci con una banda terapeutica ristretta o per i quali la posologia varia moltissimo da paziente a paziente; in tal caso, infatti, diventa di fondamentale importanza poter disporre di un test genetico che a priori possa predire la risposta al farmaco e che quindi permetta di individuare la dose efficace e non tossica per ogni individuo.

Il razionale dell'introduzione dei test genetici nella pratica clinica è che da un lato si somministra al paziente la terapia più efficace evitando quindi sia lo spreco di tempo collegato alla scelta di regimi terapeutici inadatti, sia ricadute psicologiche negative sul paziente stesso dovute all'inappropriatezza della terapia prescritta; dall'altro lato è possibile valutare a priori il rischio di eventi avversi e quindi di evitare di somministrare farmaci, o dosi troppo elevate di farmaci, che potrebbero danneggiare il paziente. Non bisogna dimenticare, infatti, che ogni anno negli USA si verificano più di 2 milioni di casi di reazioni avverse al farmaco e che negli Stati Uniti ed in Europa la quarta causa di morte è rappresentata proprio dalle reazioni avverse ai

⁹ I biomarcatori genomici vengono classificati, in relazione all'utilizzo clinico dei relativi test, in tre livelli: test obbligatorio, test raccomandato e test solo informativo.

farmaci. Esse costituiscono un problema clinico ma anche economico rilevante, esasperato dal fatto che i farmaci sviluppati fino ad oggi non tengono conto delle singole individualità dei soggetti bensì della popolazione media, per cui funzionano per la stragrande maggioranza della popolazione ma risultano inefficaci se non tossici per una buona fetta della stessa. Tale riflessione ha portato le case farmaceutiche a cambiare l'iter di sviluppo dei farmaci, introducendo come parte integrante di questo processo gli studi di farmacogenetica i quali possono generare informazioni cruciali per la comprensione del profilo di efficacia e tollerabilità del farmaco e per supportare le decisioni da prendere sullo sviluppo del farmaco stesso. Di pari passo con la conoscenza di nuovi biomarcatori si è sviluppato un numero sempre maggiore di kit diagnostici in grado di analizzare tali markers tanto che la terapia personalizzata si sta affermando rapidamente.

Alla luce di quanto riportato emerge che sicuramente la farmacogenetica ha consentito la trasformazione della medicina tradizionale in medicina molecolare, cambiamento di certo legato anche al progresso delle tecniche e tecnologie di analisi e degli strumenti diagnostici.

Per poter essere usato in clinica, un test farmacogenetico deve possedere determinate caratteristiche. In primo luogo è necessario individuare un'associazione tra un genotipo e la risposta ad un certo farmaco nella popolazione generale o in una sottopopolazione; deve essere comprovata la validità analitica e clinica del test, quindi il metodo di determinazione del genotipo deve possedere sufficiente sensibilità, specificità e valore predittivo; infine, ci devono essere evidenze scientifiche riguardo all'utilità clinica del test, cioè la sua applicazione in ambito clinico deve consentire di migliorare la risposta alla terapia e la compliance del paziente e quindi il rapporto rischio/beneficio legato alla somministrazione del farmaco.

Abacavir ed allele HLA-B*57:01

Tra i test farmacogenetici, per i quali vi sono evidenze scientifiche rilevanti sul vantaggio derivante dall'applicazione della farmacogenetica, ben nota è la ricerca dell'allele HLA-B*57:01 in pazienti con infezione da HIV-1.

Per alcuni farmaci è già noto il legame tra tollerabilità e/o funzionalità ed alcune caratteristiche genetiche individuali. Fra questi un esempio è dato da abacavir, una

guanosina, inibitore nucleosidico della trascrittasi inversa, approvato per il trattamento dell'HIV in combinazione con altri antiretrovirali. Abacavir è il primo farmaco su cui è stato effettuato un percorso di studi che ha portato all'individuazione di un test farmacogenetico *fortemente raccomandato* dalle Linee Guida sull'utilizzo dei farmaci antiretrovirali^[13,14] prima di iniziare una terapia antiretrovirale contenente abacavir, ed è altresì *consigliato* per tutti i nuovi riscontri di infezione per poterne disporre in caso di scelta di regime terapeutico.

E' stato infatti dimostrato che l'allele HLA-B*57:01 in pazienti con infezione da HIV ha un significato altamente predittivo per l'individuazione dei soggetti ipersensibili.

La reazione di ipersensibilità ad abacavir è una reazione sistemica che si manifesta con una combinazione di sintomi che includono febbre, sensazione di malessere generale, vertigini o mal di testa, disturbi gastrointestinali (nausea, vomito, diarrea o dolore addominale), sintomi respiratori (dispnea, tosse). Il rash cutaneo si presenta spesso come ultimo sintomo ed in più del 30% dei pazienti con ipersensibilità è assente. Il tempo medio di esordio dei sintomi è di 7-8 giorni dall'inizio del trattamento, sebbene in alcuni casi si possono presentare entro 1-2 giorni oppure entro le prime 6 settimane. I sintomi peggiorano con il prosieguo della terapia e possono essere pericolosi per la vita. Questi sintomi generalmente si risolvono dopo la sospensione del farmaco. La riassunzione di abacavir dopo una reazione di ipersensibilità provoca un'immediata ricomparsa dei sintomi entro poche ore. Tale ripresentazione dei sintomi è generalmente più grave della forma verificatasi all'inizio e può includere tachicardia, ipotensione ed in alcuni casi forte dolore ai linfonodi cervicali ed ascellari^[15].

Oggi grazie all'introduzione del test farmacogenetico sono stati drasticamente ridotti i casi di ipersensibilità e reazioni avverse al farmaco. Ciò è ben documentato anche dai risultati dello studio prospettico randomizzato **PREDICT 1** (*Prospective Randomized Evaluation of DNA Screening in a Clinical Trial*) che ha coinvolto, da Aprile a Settembre 2006, 265 centri ospedalieri (di cui 38 in Italia) per un totale di 1956 pazienti. I partecipanti sono stati randomizzati in cieco in due gruppi di confronto: il gruppo di "Screening HLA-B*57:01" in cui i pazienti eseguivano il test di tipizzazione HLA-B*57:01 ed assumevano il farmaco solo se il test era negativo, ed il gruppo di controllo "Gestione clinica standard" in cui i pazienti assumevano il

farmaco come parte della loro terapia senza essere stati preventivamente sottoposti al test. I risultati dello studio hanno dimostrato che lo screening HLA-B*57:01 annulla le reazioni di ipersensibilità diagnosticate clinicamente e confermate con patch test e riduce a meno del 50% le reazioni di ipersensibilità diagnosticate con solo criterio clinico^[16] (Fig. 10).

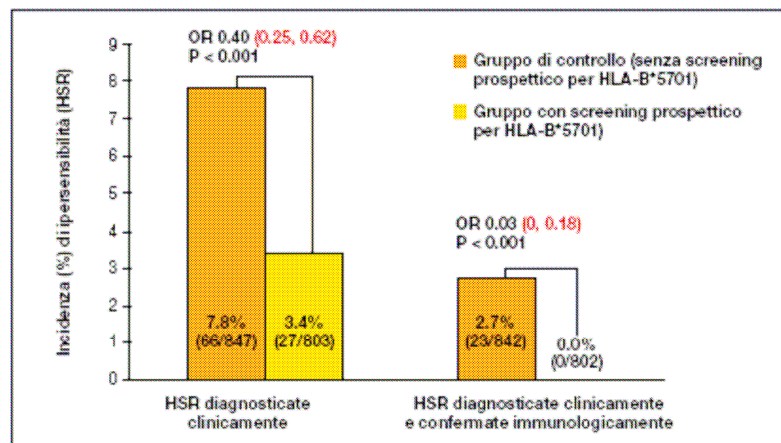


Figura 10 Risultati dello studio PREDICT-1

Sulla base di questi risultati, è attualmente controindicato l'impiego di abacavir in pazienti portatori dell'allele HLA-B*5701. Il test genetico non deve comunque sostituire un accurato counselling sulle possibili reazioni avverse ed un'attenta osservazione clinica, dal momento che un test negativo non esclude in assoluto la possibilità che l'evento avverso si manifesti.

Recenti studi volti a identificare le ragioni molecolari per cui l'allele HLA-B*57:01 scatena la sindrome di ipersensibilità ad abacavir, ne hanno focalizzato la causa nella particolare conformazione strutturale del sito di legame delle molecole MHC di classe I, che legherebbero con elevata affinità neoautoantigeni derivati dalla coniugazione del farmaco con uno o più peptidi self, innescando la reazione immunitaria. Tale risposta a *cellule T CD8 della memoria* ad abacavir in soggetti che non hanno mai assunto il farmaco sembra quindi sia dovuta ad una cross-reazione dei linfociti T CD8, già attivati in precedenza da un altro antigene, con il complesso abacavir-HLA-B57:01-peptide endogeno^[17].

PARTE SPERIMENTALE

OBIETTIVO DELLA TESI

La *terapia antiretrovirale di combinazione (cART)* nei soggetti con infezione da HIV-1 o in AIDS conclamato è finalizzata a ridurre la morbosità e la mortalità correlata all'infezione e migliorare, di conseguenza, la qualità della vita dell'individuo.

La soppressione virologica plasmatica (non rilevabilità di HIV-RNA) entro 3-6 mesi derivante dal trattamento assunto secondo prescrizione consente il raggiungimento di tale obiettivo e, al contempo, comporta un recupero dell'assetto immunologico del paziente, una riduzione dei livelli di infiammazione cronica e delle complicanze ad essa associate. Anche la riduzione del rischio di trasmissione dell'infezione (conseguente al raggiungimento della non rilevabilità di HIV-RNA), il possibile contenimento dell'epidemia che ne deriva, e "l'effetto (auto)de-stigmatizzante" per le persone con HIV/AIDS potenzialmente associato a questi risultati sono obiettivi di grande rilevanza socio-sanitaria da perseguire nella scelta del trattamento farmacologico.

Nella terapia di *combinazione* anti-HIV si dovrà scegliere, dunque, un'associazione di farmaci antiretrovirali detta *regime terapeutico*. In linea di massima sono due i regimi terapeutici seguiti nella cura dei pazienti: uno prevede l'impiego di farmaci contenenti abacavir, come ad esempio *kivexa* (i principi attivi sono *abacavir* e *lamivudina*, entrambi inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa); l'altro invece, che è quello di prima scelta, implica l'utilizzo del farmaco *truvada* (i principi attivi sono *emtricitabina* e *tenofovir*, anch'essi entrambi inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa). Quest'ultimo farmaco però, in trattamenti a lungo termine, può portare a complicazioni a livello dell'apparato scheletrico per la progressiva diminuzione della densità ossea o disfunzioni a carico del rene. Laddove, quindi, sussista la necessità di cambiare regime terapeutico iniziando una terapia contenente *abacavir* è fortemente raccomandato eseguire il test genetico per la ricerca dell'allele HLA-B*57:01^[18].

A tal fine, nell'anno 2014 l'Infettivologo responsabile dell'Ambulatorio di Malattie Infettive dell'Ospedale Maggiore di Bologna (sede distaccata dell'Unità Operativa di Malattie Infettive del Policlinico S. Orsola-Malpighi), in accordo con il Laboratorio Analisi dell'Ospedale Maggiore – settore di Biologia Molecolare e Citogenetica – ha

programmato un piano di screening per la ricerca dell'allele HLA-B*57:01. Nel corso dell'intero anno sono stati screenati 788 pazienti afferenti all'Ambulatorio di Malattie Infettive. I risultati ottenuti hanno permesso di dividere i pazienti in due sottopopolazioni di soggetti positivi e negativi al test. Nell'ambito della sottopopolazione dei soggetti positivi al test è stata, pertanto, valutata la prevalenza dell'allele HLA-B*57:01. Sono state inoltre analizzate le differenze tra le due sottopopolazioni prendendo in considerazione oltre che l'età, il sesso e la provenienza, anche i seguenti parametri (ottenuti dallo stesso prelievo di sangue): la conta dei linfociti T CD4+, la conta dei linfociti T CD8+, il rapporto CD4+/CD8+ e la carica virale.

MATERIALI E METODI

Come già precedentemente sottolineato, in questo lavoro di tesi è stato esaminato per la ricerca dell'allele HLA-B*57:01 un campione di 788 pazienti con infezione da HIV-1, seguiti per il follow-up dall'equipe medica dell'Ambulatorio di Malattie Infettive dell'Ospedale Maggiore di Bologna.

Una volta effettuati i prelievi presso l'Ambulatorio di Malattie Infettive, i campioni di sangue fresco intero, raccolto in provette Vacutainer contenenti EDTA¹⁰ come anticoagulante (*Etilen-Diamina-TetrAcetato*), sono stati inviati presso l'accettazione del Laboratorio Analisi dell'Ospedale Maggiore e successivamente consegnati al Settore di Biologia Molecolare e Citogenetica. I campioni sono stati conservati per breve tempo a +2°/+8° C in attesa di procedere con la fase analitica, oppure sono stati congelati a -20° C se si rimandava al giorno dopo la seduta di estrazione del DNA.

Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto dai linfociti di sangue periferico con procedura manuale utilizzando il kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit* della ditta QIAGEN (marcato ce IVD).

Ogni seduta di lavoro è stata ottimizzata per l'estrazione di DNA da 10 campioni e per ognuno è stato allestito un micro-tubo da 2 ml opportunamente siglato. All'interno di ciascun micro-tubo vengono pipettati 200 µl di sangue intero di ciascun campione, 200 µl di AL buffer [(Lysis buffer) 6 M guanidina, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% TritonX-100 pH 4,4 (25° C)] e 20 µl di proteinasi K (endopeptidasi) per permettere la lisi cellulare che porta alla rottura delle membrane dei globuli bianchi e l'inattivazione delle nucleasi endogene DNasi. A questo punto la miscela viene incubata a 56° C nel termoblocco per 10 minuti e subito dopo si esegue una breve spinnata del micro-tubo contenente il campione da analizzare. Per

¹⁰ Il campione di sangue, per essere processato con metodiche di biologia molecolare, deve essere trattato con EDTA (*Etilen-Diamina-TetrAcetato*), in quanto altri coagulanti, come ad esempio l'eparina, sono potenti inibitori della Taq polimerasi e potrebbero quindi alterare l'efficienza della reazione di amplificazione.

la rimozione delle proteine e la precipitazione dell'acido nucleico, si aggiungono 200 μ l di etanolo (96-100%) nella provetta di ciascun campione. Il lisato con volume di 540 μ l viene caricato all'interno del filtro High-Pure sterile, assemblato con una colonnina, dove il DNA si lega alla membrana di silice. Segue 1 minuto di centrifugazione a 8000 rpm in una microcentrifuga in modo da eliminare il restante lisato. Si rimuove la colonnina contenente il liquido di scarto e se ne assembla una nuova con lo stesso filtro High-Pure di ciascun campione. Si aggiungono 500 μ l di AW1 buffer [(Wash buffer 1) 5 M guanidina, 20 mM Tris-HCl pH 6,6 (25° C)] e si centrifuga a 8000 rpm per 1 minuto. Si elimina la colonnina con il liquido di scarto e si assembla il filtro High-Pure con una nuova colonna, si aggiungono 500 μ l di AW2 buffer [(Wash buffer 2) 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, aggiunta di etanolo 70% pH 7,5 (25° C)] e si centrifuga a 14000 rpm per 3 minuti. Di nuovo si elimina la colonnina con il liquido di scarto, si assembla il filtro High-Pure con una nuova colonnina e si ripete la centrifugazione alla massima velocità per 1 minuto. Si elimina la colonnina con il liquido di scarto e si assembla il filtro High-Pure con una provetta tipo Eppendorf RNasi free da 1,5 ml. Nella zona centrale del filtro si aggiungono 200 μ l di Elution Buffer [10 mM Tris-HCl pH 8,5 (25° C)], e si lascia incubare a temperatura ambiente per circa 5 minuti. Infine, si centrifuga a 8000 rpm per 1 minuto per favorire la precipitazione dell'acido nucleico. La procedura è standardizzata in modo da ottenere, con un volume di 200 μ l di Elution Buffer, una concentrazione finale di DNA pari a 34 ng/ μ l. Il DNA genomico così estratto può essere utilizzato immediatamente per l'amplificazione genica tramite PCR, previa valutazione allo spettrofotometro per l'analisi quantitativa, oppure può essere conservato a -20° C.

Quantificazione del DNA

La quantificazione del DNA è stata ottenuta misurandone l'assorbanza a $\lambda=260$ nm usando lo spettrofotometro Beckman DU 530. Considerando che ad 1 unità di assorbanza a 260 nm corrispondono 50 μ g/ml di DNA a doppia elica, la concentrazione di DNA viene calcolata come segue: [dsDNA(μ g/ml)] = (OD260) x [fattore di diluizione (1:25 v/v)] x (50 μ g DNA/ml)/1 OD260. Si ripete la stessa procedura di calcolo per la lettura a $\lambda=280$. La purezza del DNA estratto è stata

valutata misurando il rapporto OD260/OD280. Un rapporto compreso tra 1,5 e 2,0 indica un livello ottimale di purificazione del DNA da proteine.

Amplificazione di sequenze specifiche di DNA mediante SSP-PCR

In questi ultimi decenni lo sviluppo di un numero sempre maggiore di kit commerciali, basati su procedure standardizzate ed appropriati controlli, ha consentito di sfruttare la tecnologia PCR (*Polymerase Chain Reaction*) per l'analisi di sequenze genomiche specifiche direttamente da campione biologico con un'elevata soglia di sensibilità e specificità. Inoltre, la sensibilità e la rapidità di esecuzione di questa tecnica l'hanno resa particolarmente adatta alla diagnostica di routine in laboratorio. La PCR è una metodologia che permette l'amplificazione specifica ed esponenziale di sequenze di DNA di lunghezza variabile a partire da una quantità esigua del DNA in esame. La specificità si deve all'utilizzo di corte sequenze nucleotidiche (15-30 nt) detti *primers*, che si appaiano in maniera specifica su opposti filamenti di DNA delimitando la sequenza da amplificare. Essi, inoltre, fungono da innesco per la DNA polimerasi che catalizza l'aggiunta di dideossinucleotidi al filamento nascente. La reazione di PCR si svolge in tre fasi: fase di *denaturazione* in cui il doppio filamento di DNA si denatura, generando un singolo filamento (tutte le reazioni enzimatiche si bloccano); fase di *annealing* in cui si verifica l'appaiamento dei primers con il filamento complementare, la polimerasi si lega ed inizia a copiare il DNA template; *estensione* finale in cui le basi complementari al template sono accoppiate al primer nella direzione 3' (la polimerasi aggiunge i dNTP da 5' a 3', leggendo il template nella direzione 3'-5'). La ripetizione di queste tre fasi per un numero di volte che va da 30 a 35 permette di aumentare in modo esponenziale la popolazione di sequenze di DNA di interesse amplificate.

Per l'analisi dell'allele HLA-B*57:01 è stata utilizzata la metodica SSP-PCR (*Sequence Specific Primers-PCR*) che prevede l'utilizzo di coppie di primers perfettamente complementari solo con un allele o con un gruppo di alleli, di modo che in condizioni di PCR rigidamente controllate si verifichi l'amplificazione della sequenza bersaglio solo in presenza della sequenza di interesse. Questo metodo si basa sull'estensione del primer e perciò la riuscita della PCR dipende da un esatto

match all'estremità 3' di entrambi i primers, perciò solo se i primers sono complementari alla sequenza avviene l'amplificazione (Fig. 11).

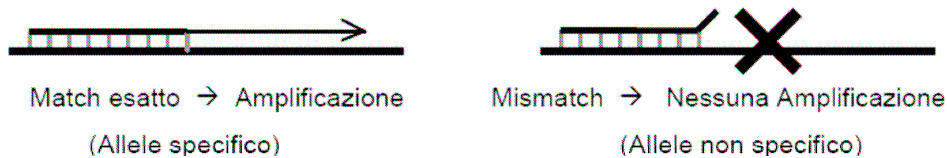


Figura 11 Principio della SSP-PCR (*Sequence Specific Primers-PCR*)

Nel laboratorio di Biologia Molecolare, presso cui ho svolto la parte pratica del mio lavoro di tesi, viene utilizzato per l'identificazione dell'allele HLA-B*57:01 il kit *HISTO TYPE B57 Happy Pack* (marcato α IVD) fornito dalla ditta Astraformedic e prodotto dalla ditta BAG Health Care. Il kit contiene un certo numero di mixes prealiquotate e liofilizzate che includono i primers allele-specifici, i primers del controllo di amplificazione interno (specifici per il gene G3PDH umano) ed i nucleotidi.

La composizione della miscela di primers consente un'identificazione affidabile dell'allele HLA-B*57:01 sulla base delle informazioni di sequenza più recenti disponibili. Per quanto riguarda la performance del kit HISTO TYPE SSP, la ditta produttrice dichiara di “*aver verificato l'accuratezza e ripetibilità della specificità di ogni miscela di primers per ciascun lotto con campioni di riferimento ad assetto antigenico HLA noto. E' stato condotto uno studio di prestazioni per tutti i kit HISTO TYPE SSP con almeno 50 campioni di DNA. Il confronto con i risultati dei test ottenuti con kit SSP di un altro fornitore non ha mostrato alcuna discrepanza*”.

Tutte le mixes prealiquotate sono fornite liofilizzate nel fondo delle provette di reazione ed i parametri di amplificazione sono ottimizzati ad un volume finale di 10 μ l. Si procede, quindi, prelevando il numero richiesto di piastre HISTO TYPE HLA-SSP (una piastra per ciascun campione) e si prepara la Master-Mix di amplificazione composta da 10 μ l di PCR-buffer 10X, 0,8 μ l di Taq-Polymerase (*Happy-Taq*, già inclusa nel kit) e 79,2 μ l di acqua distillata (volumi indicati dalla ditta produttrice per un numero di 8 reazioni). Dopo aver vortexato, si seminano 10 μ l di questa miscela nel *controllo di contaminazione* (provetta di reazione 8, colorata in blu). In seguito si

aggiungono 10 μ l della soluzione di DNA¹¹ del campione da analizzare alla Master-Mix. Si seminano 10 μ l nelle provette di reazione preseminate rimanenti (dalla 1 alla 7) cambiando il puntale dopo ogni semina (Fig. 12).

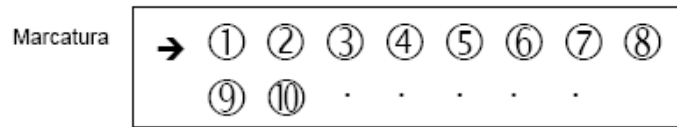


Figura 12 Piastra HISTO TYPE HLA-SSP

Si chiudono bene le provette con i rispettivi tappi, assicurandosi di non toccare con le dita la parte interna dei tappi ed il bordo superiore delle provette per evitare la contaminazione. Si scuote leggermente la piastra/striscetta verso il basso per dissolvere il pellet blu sul fondo della piastra (tutte le soluzioni PCR devono depositarsi sul fondo).

A questo punto, si mettono le provette di reazione nel termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) costituito da una piastra a 96 pozzetti (Fig. 13).



Figura 113 Termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem)

¹¹ La quantità di DNA dovrebbe essere compresa tra 25 e 40 ng per mix. A seconda della concentrazione di DNA, occorre variare le quantità di acqua e DNA da aggiungere.

Lo strumento programmabile è capace di controllare con grande precisione ed omogeneità le differenti temperature richieste nel corso della reazione di amplificazione, grazie alla combinazione di sistemi di riscaldamento e raffreddamento. Inoltre l'utilizzo di provette di piccolo volume (0,2-0,5 ml) a parete sottile aiuta a garantire un rapido passaggio del campione da una temperatura all'altra. Di seguito viene riportato il profilo di amplificazione con le rispettive temperature ed i tempi per ciascun passaggio di denaturazione, annealing ed estensione (Tabella 1).

Programma	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
Prima denaturazione	94°C	5 min	1 ciclo
Denaturazione	94°C	20 sec	5 cicli
Annealing+Estensione	67°C	1 min 5 sec	
Denaturazione	94°C	20 sec	10 cicli
Annealing	63°C	55 sec	
Estensione	72°C	45 sec	
Denaturazione	94°C	20 sec	15 cicli
Annealing	60°C	55 sec	
Estensione	72°C	45 sec	
Estensione finale	72°C	5 min	1 ciclo

Tabella 1 Parametri di amplificazione

Elettroforesi in gel di agarosio

La separazione dei prodotti ottenuti con l'amplificazione si effettua tramite *gel di agarosio in elettroforesi orizzontale*. Si prepara un gel al 2% p/v, ottenuto sciogliendo la polvere di agarosio in un appropriato volume del buffer TBE 1X (45 mM Tris-Borato, 0,5 mM EDTA pH 8), utilizzato anche per la corsa elettroforetica.

Per garantire la visualizzazione degli amplificati, nella soluzione di agarosio e TBE non ancora solidificata, si aggiunge il SYBR[®] Safe¹² in rapporto 1/20.000 v/v (sul volume finale). Si lascia polimerizzare il gel per almeno 30 minuti prima di caricare il campione. La porosità della matrice del gel è tale da consentire una separazione di frammenti dell'ordine di 100-3000 bp.

Al termine dell'amplificazione, si prelevano i campioni dal termociclatore e si carica con attenzione ciascuna miscela di reazione (10 µl) in ogni pozzetto del gel. Inoltre, si caricano 10 µl di DNA length standard per verificare se le bande degli amplificati corrispondano alle dimensioni attese.

Si imposta l'intensità del campo elettrico a 6 V/cm di lunghezza del gel (con elettrodi distanti 20 cm, 120 V circa), un valore che consente di ottenere una migrazione uniforme e relativamente veloce anche dei frammenti di dimensioni prossime al limite superiore del range di risoluzione in bp del gel. La corsa elettroforetica si esegue per 20-40 min.

Una volta posto il gel nel transilluminatore UVI_{DOC} HD2 a luce UV è possibile visualizzare i frammenti di DNA amplificati sotto forma di bande. Questo strumento è dotato del sistema di acquisizione di immagini FireReader, dedicato alla cattura di immagini di gel fluorescenti al fine di produrre la fotodocumentazione del gel in esame. Si regolano lo zoom, il diaframma ed il fuoco della videocamera in modo che le bande siano ben visibili e risaltino sullo sfondo scuro (Fig. 14).

Il collegamento in rete del transilluminatore consente la visualizzazione delle foto al pc mediante l'uso del software FireReader 1D.

Il programma permette di modificare le foto aggiungendo caselle di testo che vengono utilizzate per agevolare la lettura del gel e per evitare qualsiasi errore di associazione gel-paziente.

¹² Il SYBR[®] Safe è un composto organico aromatico facente parte del gruppo delle cianine asimmetriche, molecole dotate di attività fluorofora ed è utilizzato in biologia molecolare come colorante di acidi nucleici. Esso, infatti, è un agente intercalante e si lega preferenzialmente a molecole di DNA a doppio filamento (dsDNA). La sua maggiore sensibilità nella rivelazione di acidi nucleici unita alla sua minore pericolosità sta facendo sì che questo colorante venga utilizzato sempre più spesso come alternativa al meno costoso *bromuro di etidio*. Il bromuro è un potente mutageno mentre, ufficialmente, il SYBR[®] Safe viene indicato come non pericoloso, sebbene debba essere maneggiato con cura a causa della sua capacità di legarsi al DNA con elevata affinità.



Figura 14 Transilluminatore UVI_{DOC} HD2 (Uvitec Cambridge)

A questo punto le foto sono pronte per essere stampate ed i risultati possono essere interpretati (Fig. 15).

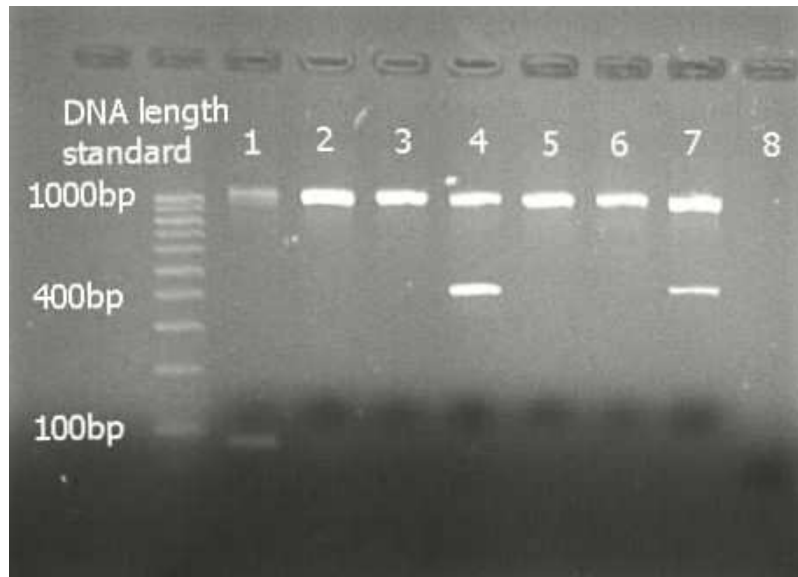


Figura 15 Foto del gel di agarosio di un campione positivo al test HLA-B*57:01

Interpretazione dei risultati

Per l'interpretazione si usa la tabella delle specificità ed il diagramma d'interpretazione (Fig. 16). Sono da considerare positive solo le bande che hanno lunghezza in bp corretta in confronto al DNA length standard.

Il controllo interno a 1070 bp deve essere chiaramente visibile nei pozzetti dove non c'è amplificazione allele-specifica. In alcuni casi dove c'è un'amplificazione allele-specifica il controllo interno può essere più debole o scomparire completamente. Inoltre, nel controllo di contaminazione (provetta di reazione 8) non dovrebbe essere visibile alcuna banda. In caso di contaminazione con DNA genomico ci sarà una banda a 282 bp. Potrebbero verificarsi bande addizionali a 78 bp, 104 bp, 176 bp e 580 bp. In caso di contaminazione con DNA amplificato ci sarà una banda a 78 bp e/o a 104 bp e/o a 176 bp e/o a 282 bp e/o a 580 bp.

Nello specifico, la presenza di tutte e tre le bande nei pozzetti 1, 4 e 7 lunghe rispettivamente 90 bp, 435 bp e 435 bp indica la presenza dell'allele HLA-B*57:01 (il test è positivo).

HISTO TYPE B57 Auswertediagramm / Evaluation diagram Lot: 406P1
 UPDATE 07/2013 (V3.0) 12/2014 SCORE: B57_V3_406P1_3.13.1

Positive reaction		1	2	3	4	5	6	7	8
Ser.Type	Spezifitäten / Specificities								
B57(17)	B*57:01:01,01:04-01:15,20w-27,29,31,33-38,40,41,43,44,47-50,52-56,58-62,64,65	1			4			7	
B57(17)	B*57:01:02,01:03	1		3	4			7	
B57(17)-	B*57:02:01,02:02,03:01,03:02,07,09,12,17,26N,39,42,46,57,63	1	2		4				
-	B*57:05	1	2						
-	B*57:04w,06,08,13,19,30	1	2		4			7	
-	B*57:10,15	1			4	5		7	
-	B*57:11,16 / *58:36	1						7	
-	B*57:14,18	1			4		6	7	
-	B*57:32	1			4				
B58(17)-	B*35:226 / *57:45,51 / *58:01:01-02,05,06,07,10N-17N,18,19,21,23-28,29w-31N,33-35,37-39N,40-46 / A*02:147,151,188 / C*15:12							7	
-	B*58:08,01,06,02		2				6		
-	B*58:09						6	7	
-	B*58:22		2					7	
-	B*58:27,28		2						
Kontaminationskontrolle / Contamination Control									8
Länge / Size (bp)		90	75/415 /500/ 535	495/ 640	435	535/ 370	480/ 580	435	

Figura 16 Tabella delle specificità e diagramma d'interpretazione del test genetico HLA-B*57:01

Raccolta dati

Per ciascun paziente vengono compilate schede cartacee nelle quali si riportano i relativi dati anagrafici ed il risultato del test HLA-B*57:01. Si allegano la foto del gel di agarosio ed il referto completo di tutti gli esami presenti in richiesta. Una volta complete, le schede vengono conservate nell'archivio cartaceo di settore.

Sono stati, inoltre, riportati in un file di Microsoft Excel tutti i dati utili per il lavoro di tesi ed elaborati successivamente per un'analisi epidemiologica di base.

RISULTATI

Sono stati esaminati in totale 788 pazienti nell'anno 2014 di cui 57 sono risultati positivi per l'allele HLA-B*57:01. Non ci sono stati risultati di dubbia interpretazione e tutti i positivi sono stati ricontrrollati e si sono riconfermati.

In prima istanza è stata valutata la prevalenza dell'allele HLA-B*57:01 nella popolazione in studio: si è riscontrata una percentuale di positività del 7,2% in linea con i dati presenti in letteratura^[19] (Grafico 1).

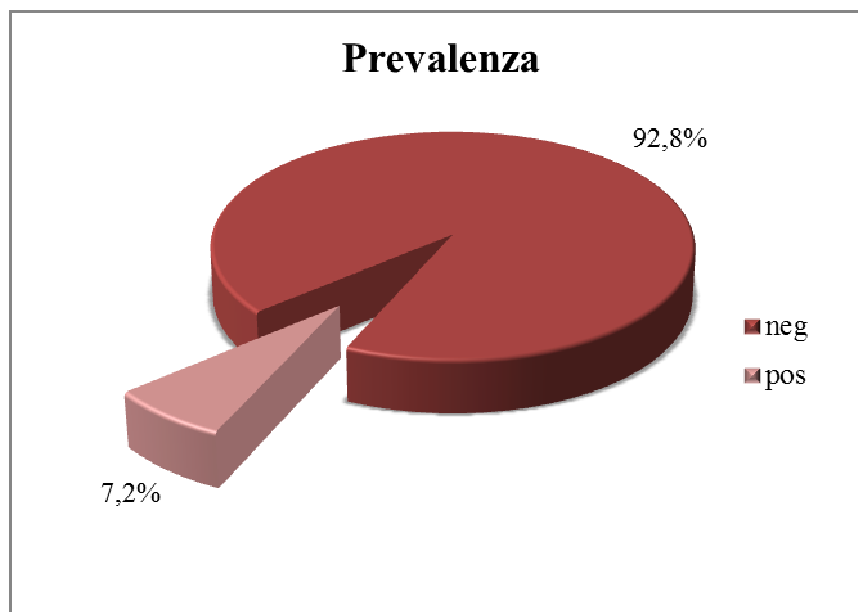


Grafico 1

Nell'ambito della sottopopolazione dei pazienti positivi al test, suddivisi nelle diverse etnie, si nota una netta prevalenza di caucasici analogamente a quanto riportato in letteratura^[20] (Grafico 2).

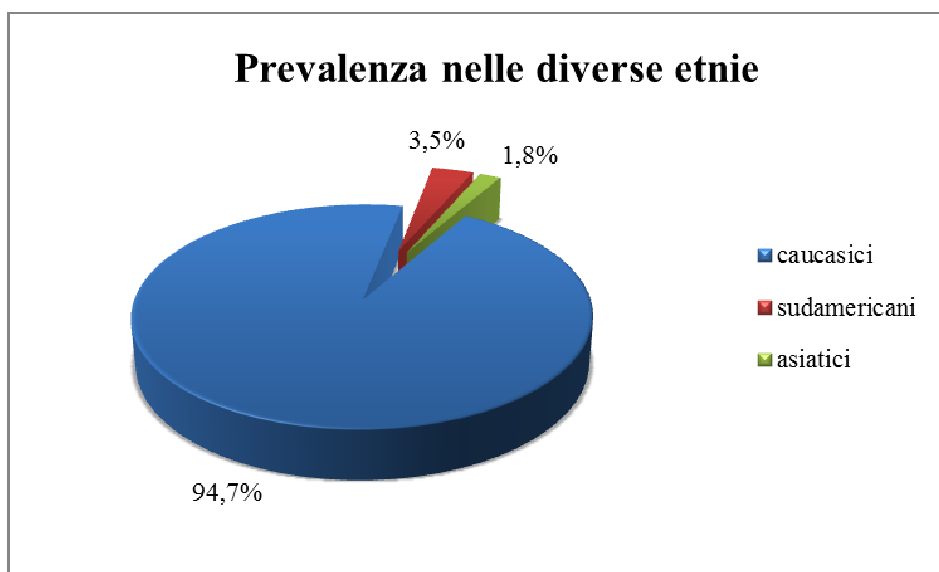


Grafico 2

E' stata successivamente analizzata la percentuale di soggetti maschili e femminili nelle due sottopopolazioni. Dal grafico 3 si evince che i maschi sono pressoché ugualmente rappresentati tra i negativi ed i positivi al test (73,5% e 66,7% rispettivamente) così come le femmine (26,5% e 33,3% rispettivamente).

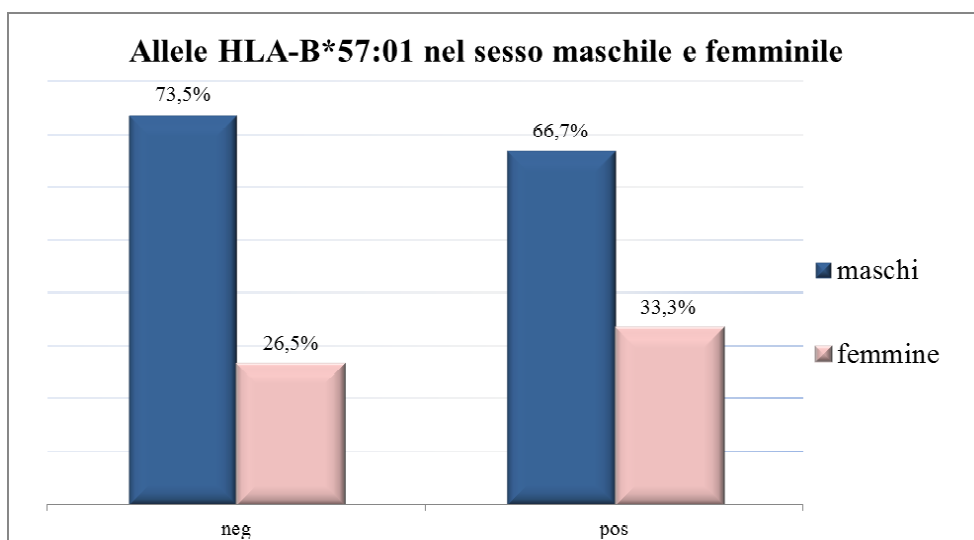


Grafico 3

E' stata poi valutata la prevalenza dell'allele HLA-B*57:01 nei due sessi come rappresentato nei grafici 4 e 5.

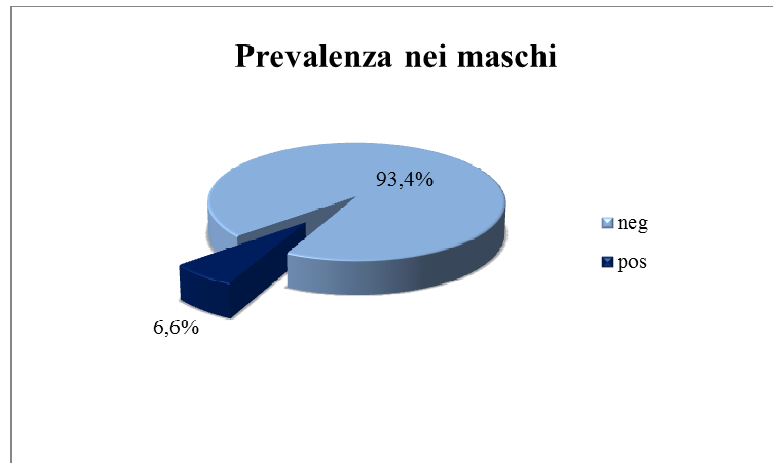


Grafico 4

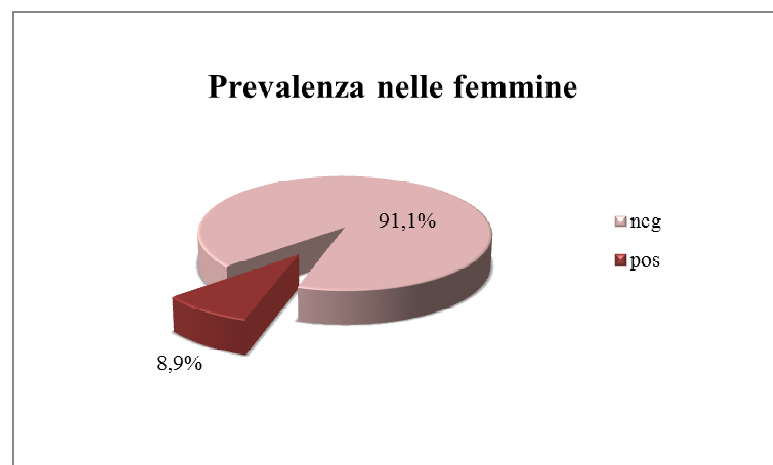


Grafico 5

L'allele si riscontra con una frequenza lievemente maggiore nelle femmine rispetto ai maschi.

Studiando i pazienti suddivisi per età non si notano differenze tra le due sottopopolazioni (Tabella 2).

	HLA-B*57:01 negativi	HLA-B*57:01 positivi
Età media	48	48
Range di età	19-84	31-74

Tabella 2

In entrambi i gruppi l'età media è di 48 anni e vi sono anche pazienti anziani (1,7% di over 70 anni tra i positivi e 1,6% fra i negativi).

Inoltre, sono stati studiati i vari marker di progressione della malattia nelle due sottopopolazioni che appaiono sostanzialmente analoghe per assetto immunologico e viremia (Tabella 3), come era da attendersi dato che i pazienti erano tutti già in terapia all'inizio dello studio.

	HLA-B*57:01 negativi	HLA-B*57:01 positivi
CD4+ (%)	30	31
CD4+ (cellule/mm ³)	673	683
CD8+ (%)	42	39
CD8+ (cellule/mm ³)	957	856
CD4+/CD8+	0,83	0,90
HIV RNA (copie/ml)	3864	3691

Tabella 3

Il grafico 6 rappresenta il valore assoluto dei linfociti T CD4+ nella sottopopolazione dei positivi al test. E' stato scelto come valore minimo $<200/\text{mm}^3$ che corrisponde ad una immunodeficienza grave con alta probabilità di sviluppare infezioni opportunistiche, e come valore massimo $>500/\text{mm}^3$ che è conforme ad una condizione immunitaria non ancora compromessa.

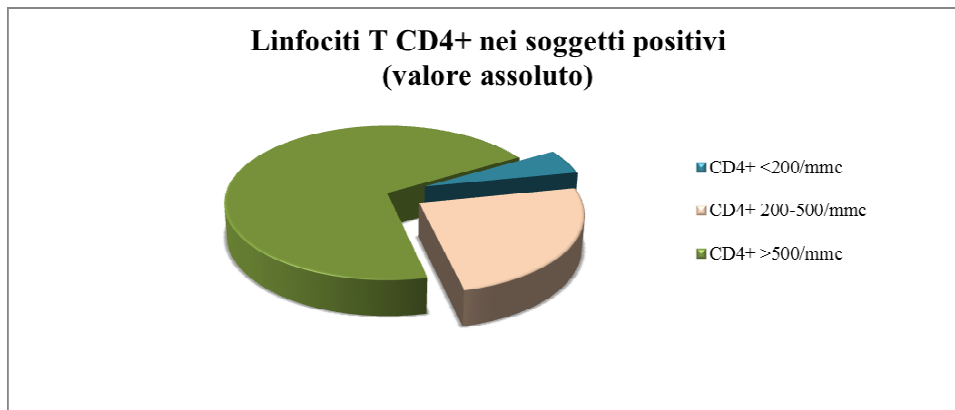


Grafico 6

Nella sottopopolazione dei negativi non si notano sostanziali differenze nella conta assoluta dei linfociti T CD4+ rispetto ai positivi (Grafico 7).

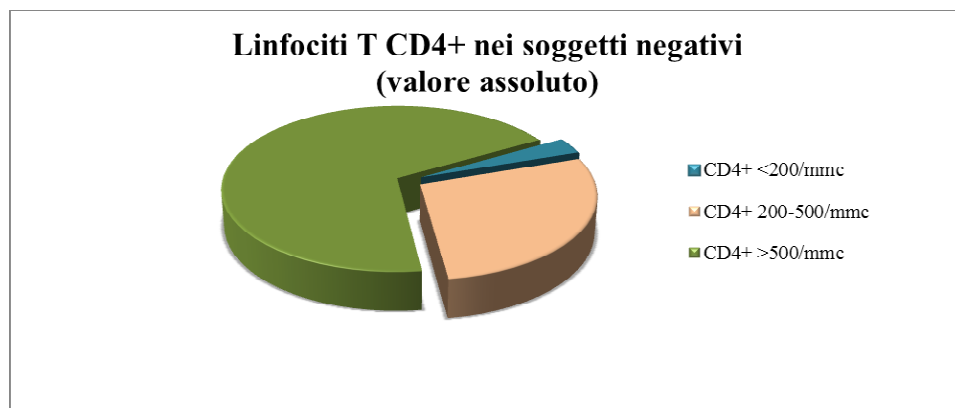


Grafico 7

Nello studio sono state anche valutate le percentuali di linfociti T CD4+. In questo caso si è scelto il valore minimo <14% che corrisponde ad una grave immunodeficienza. Come si deduce dal grafico 8 non vi sono differenze significative tra le due sottopopolazioni. I pazienti con meno del 14% di linfociti T CD4+ sono il 5,4% nei negativi ed il 7,1% nei positivi.

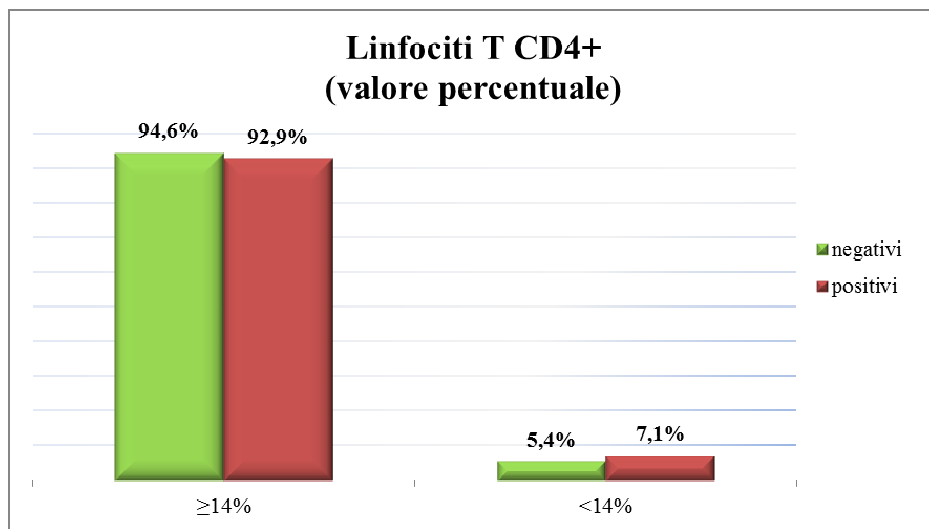


Grafico 8

Nello studio, infine, si è cercato di valutare la progressione della malattia riesaminando i pazienti sia positivi che negativi a 12 mesi dal primo test: non si notano significative variazioni dei linfociti T CD4+ né in percentuale né in valore assoluto (Grafico 9).

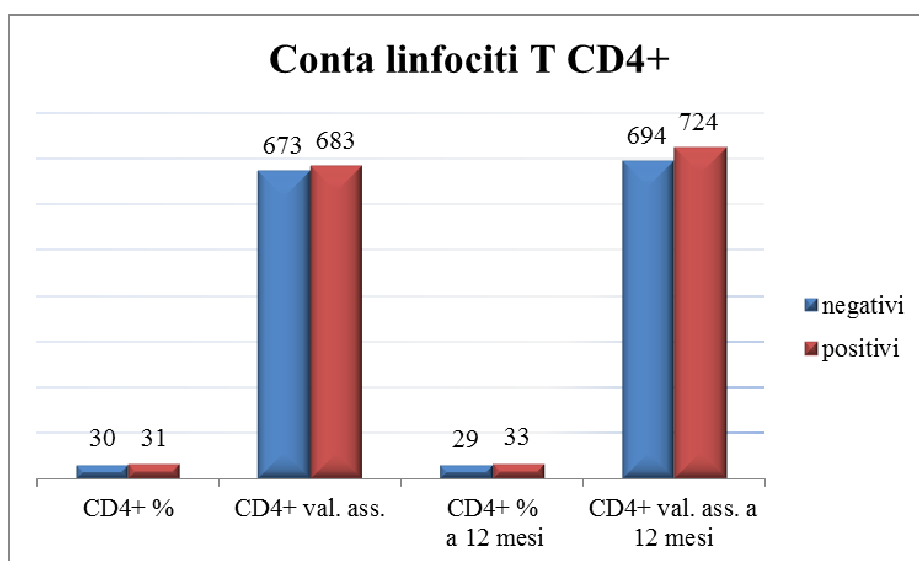


Grafico 9

Nei pazienti negativi a 12 mesi si nota un innalzamento della carica virale media di circa il 18,8%, mentre nei pazienti positivi per l'allele HLA-B*57:01 si riscontra una netta riduzione della viremia media (-56,6%) (Grafico 10 e Tabella 4).

	HIV RNA (copie/ml)	HIV RNA (copie/ml) a <u>12 mesi</u>
HLA-B*57:01 negativi	3864	4593
HLA-B*57:01 positivi	3691	1602

Tabella 4

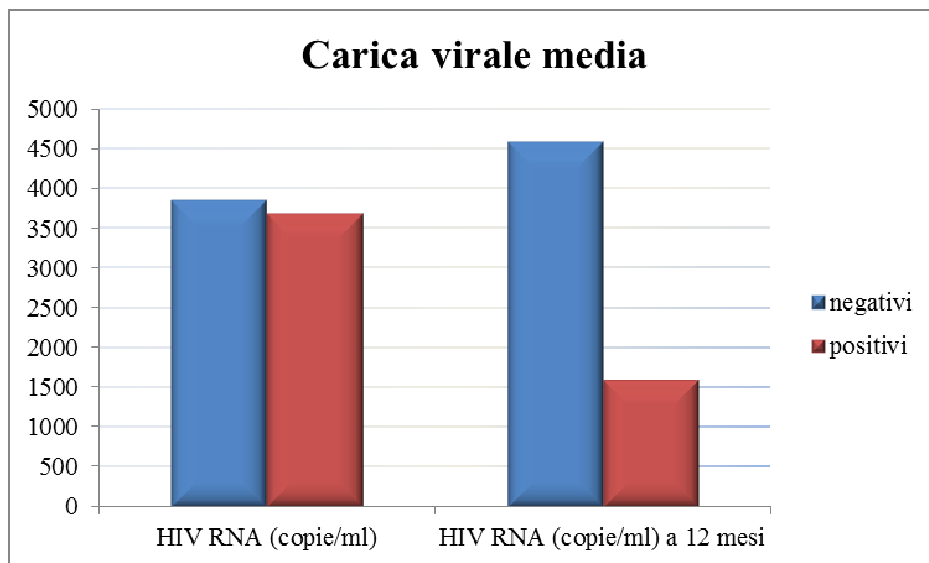


Grafico 10

E' importante però sottolineare che le variazioni della viremia dipendono da diversi fattori, tra cui l'efficacia e la durata della terapia, la compliance del paziente e la carica virale basale, i quali non sono stati analizzati nello studio.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il trattamento con farmaci antiretrovirali contenenti l'agente abacavir è consentito solo se il paziente non presenta l'allele marker HLA-B*57:01, identificabile con tecniche di biologia molecolare.

Abacavir è altamente efficace e può essere utilizzato in trattamenti a lungo termine per i pazienti affetti da HIV. Sfortunatamente, però, il 4-8% di persone trattate mostrano una reazione di ipersensibilità a questo farmaco. La reazione sistemica avviene nelle prime 6 settimane di trattamento, e può condurre a pesanti conseguenze patologiche. In studi precedenti si pensava che ci fosse una associazione significativa tra la reazione di ipersensibilità ad abacavir e l'allele HLA-B*57:01. Questa ipotesi è stata poi confermata nel primo studio a livello mondiale per la validazione di un marker genetico in relazione all'effetto collaterale di un farmaco. I risultati di tale studio hanno indicato che, prima di iniziare la terapia, tutti i pazienti con infezione da HIV (indipendentemente dalla loro etnia) dovrebbero essere tipizzati per la presenza dell'allele HLA-B*57:01, poiché la sua assenza potrebbe ridurre significativamente la frequenza di una reazione di ipersensibilità. I pazienti che al contrario presentano l'allele HLA-B*57:01 non dovrebbero essere sottoposti a trattamento con abacavir, a meno che non sia possibile una terapia alternativa. In questo caso devono essere presi in considerazione la storia della terapia ed i risultati di test di resistenza. Nel caso di un test HLA-B*57:01 negativo, tuttavia, potrebbe ancora verificarsi una reazione di ipersensibilità. Pertanto, il paziente non andrebbe trattato con abacavir, qualora non si possa escludere clinicamente una reazione di ipersensibilità.

Recentemente nella tipizzazione HLA sono stati fatti molti progressi mediante l'utilizzo della *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Il sequenziamento degli alleli HLA ha reso possibile la tipizzazione a livello del DNA con una più alta risoluzione ed ha portato a trovare l'associazione tra ipersensibilità all'abacavir e HLA-B*57:01. Per l'analisi dell'allele HLA-B*57:01 è stata utilizzata la metodica SSP-PCR (*Sequence Specific Primers-PCR*) che prevede l'utilizzo di coppie di primers perfettamente complementari solo con un allele o con un gruppo di alleli, di modo che in condizioni di PCR rigidamente controllate si verifichi l'amplificazione della sequenza bersaglio solo in presenza della sequenza di interesse che verrà successivamente evidenziata dall'elettroforesi in gel di agarosio.

Nel corso del 2014 sono stati studiati 788 pazienti con infezione da HIV-1 screenandoli per la presenza dell'allele HLA-B*57:01 e caratterizzandone lo stato immunologico e la viremia.

E' stata riscontrata una prevalenza dell'allele del 7,2% in linea con i dati presenti in letteratura e verosimilmente correlata al fatto che i pazienti studiati sono in larga maggioranza caucasici.

La percentuale di positività per l'allele è analoga fra i maschi e le femmine.

L'età media dei pazienti è di 48 anni per entrambi i gruppi e lo studio ha coinvolto anche 13 pazienti over 70 anni.

Non si evidenziano grandi differenze tra le due sottopopolazioni per quanto riguarda lo stato immunologico sia all'inizio dello studio che a 12 mesi. Si è invece notata una netta riduzione della carica virale media a 12 mesi nei pazienti positivi. Non è possibile però formulare una correlazione diretta tra la presenza dell'allele e la riduzione della viremia media perché nello studio non sono stati analizzati diversi fattori che ne influenzano le variazioni, quali l'efficacia e la durata della terapia, l'aderenza del paziente al trattamento e la carica virale basale.

BIBLIOGRAFIA

1. La Placa *Principi di Microbiologia Medica*, 524-529; 656-673, Società Editrice Esculapio.
2. Dianzani F., Antonelli G., Capobianchi M. R., Dolci A. *Manuale di Virologia Medica*, 145-158, McGraw-Hill.
3. Janeway, Travers *Immunobiologia*, 4:1-4:30, Piccin.
4. Pantaleo G., Graziosi C., Fauci A.S. *The immunopathogenesis of human deficiency virus infection*. N. Engl. J Med. 328: 327-335, 1993.
5. Gao X., O'Brien T. R., Welzel T. M., Marti D., Qi Y., Goedert J. J., Phair J., Pfeiffer R., Carrington M. *HLA-B alleles associate consistently with HIV heterosexual transmission, viral load and progression to AIDS, but not susceptibility to infection*. AIDS 24(12): 1835-1840, 2010.
6. Migueles S. A., Sabbaghian M. S., Shupert W. L., Bettinotti M. P., Marincola F. M., Martino L., Hallahan C. W., Selig S. M., Schwartz D., Sullivan J., Connors M. *HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-Infected long term nonprogressors*. PNAS 97(6): 2709-2714, 2000.
7. The UK Collaborative HIV Cohort Study Steering Committee *HLA B*5701 status, disease progression, and response to antiretroviral therapy*. AIDS 27: 2587-2592, 2013.
8. Zauli G., Vitale M., Re MC., Furlini G., Zamai L., Falcieri E., Gibellini D., Visani G., Davis B.R., Capitani S. et al. *In vitro exposure to human immunodeficiency virus type 1 induces apoptotic cell death of the factor-dependent TF-1 haematopoietic cell line*. Blood.83: 167-175, 1994.

9. Langford S. E., Ananworanich J., Cooper D. A. *Predictors of disease progression in HIV infection: a review*. *AIDS Research and therapy* 4(11), 2007.
10. Deeks S. G. *Antiretroviral treatment of HIV infected adults*. *BMJ* 332: 1489-93, 2006.
11. Hirsch M.S., Brun-Vezinet F., D'Aquila R.T., et al. *Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection*. Recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 283: 2417-2426, 2000.
12. Ventola C. L. *Pharmacogenomics in Clinical Practice Reality and Expectations*. *P&T* 36(7): 412-450, 2011.
13. Linee Guida Italiane sull'utilizzo dei farmaci antiretrovirali e sulla gestione diagnostico-clinica delle persone con infezione da HIV-1. SIMIT in collaborazione con il Ministero della Salute, 17 Dicembre 2015.
14. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. March 28, 2013.
15. Malla S. A., Phillips E. *Abacavir hypersensitivity reaction*. UpToDate® Mar 13, 2015.
16. Mallal S., Phillips E., Carosi G., Molina J. M., Workman C., Tomažič J., Jägel-Guedes E., Rugina S., Kozyrev O., Cid J. F., Hay P., Nolan D., Hughes S., Hughes A., Ryan S., Fitch N., Thorborn D., Benbow A. *HLA-B*5701 Screening for Hypersensitivity to Abacavir*. *N. Engl. J Med.* 358: 568-79, 2008.
17. Lucas A., Lucas M., Strhyn A., Keane N. M., McKinnon E., Pavlos R., Moran E. M., Meyer-Pannwitt V., Gaudieri S., D'Orsogna L., Kalams S., Ostrov D. A., Buus S., Peters B., Mallal S., Phillips E. *Abacavir-Reactive Memory T Cells Are Present in Drug Naïve Individuals*. *PloS ONE* 10(2), 2015

18. Hetherington S., McGuirk S., Powell G., et al. *Hypersensitivity reactions during therapy with the nucleoside reverse transcriptase inhibitor abacavir*. Clin. Ther. 23: 1603, 2001.
19. Mallal S., Nolan D., Witt C., Masel G., Martin A. M., Moore C., Sayer D., Castley A., Mamotte C., Maxwell D., James I., Christiansen F. T. *Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor*. Lancet 359: 727-732, 2002.
20. Orkin C., Wang J., Bergin C., Molina J. M., Lazzarin A., Cavassini M., Esser S., Gomez Sirvent J. L., Pearce H. *An epidemiologic study to determine the prevalence of the HLA-B*5701 allele among HIV-positive patients in Europe*. Pharmacogenet Genomics 20(5): 307-14, 2010.

SITI INTERNET CONSULTATI:

www.aidsinfo.nih.gov

www.cdc.gov/hiv

www.uptodate.com