

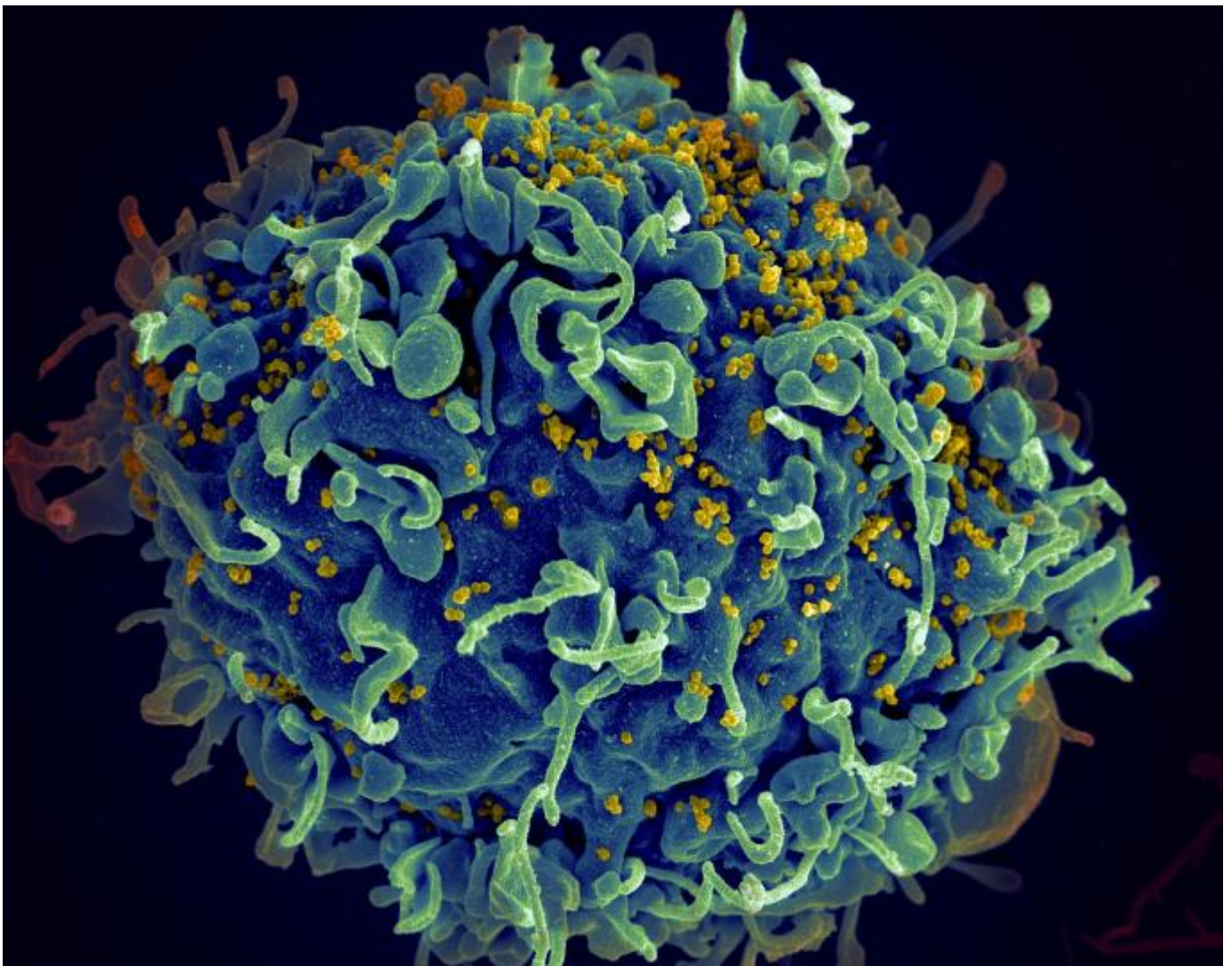


Pinton Chiara

5 F

Esame di Stato a. s. 2015/2016

HIV: DIAGNOSI e TERAPIA



Indice

1. Introduzione.....	pg. 3
2. Laboratorio.....	pg. 3
• Batteriologia; - Spettrometro di Massa;	
• Virologia;	
3. Diagnostica dell'HIV.....	pg. 10
• Controllo qualitativo; - ELISA; - Western Blot;	
• Controllo quantitativo; - Real-Time PCR quantitativa;	
4. Terapia: HAART, High Active Antiretroviral Therapy.....	pg. 16
• Ciclo replicativo dell'HIV;	
• Farmaci antiretrovirali;	
• Terapia; - Descrizione; - Problema della latenza;	
5. Bibliografia e sitografia.....	pg. 22

Introduzione

L'anno scorso la scuola ha offerto agli studenti del quarto anno la possibilità di partecipare ad attività di stage presso diversi enti e io ho scelto l'Azienda Ospedaliera di Padova, in quanto all'università vorrei iscrivermi a Medicina per poter diventare in futuro una ricercatrice; all'ospedale ho passato la prima settimana nel reparto e nell'ambulatorio di gastroenterologia e la seconda nel laboratorio di microbiologia e virologia, trovando particolarmente interessante il lavoro di diagnosi dell'HIV attraverso una macchina in grado di quantificare la presenza del virus nel sangue dei pazienti. Per questo motivo ho deciso di approfondire i metodi di diagnosi e cura dell'AIDS, Acquired Immune Deficiency Syndrome (sindrome da immunodeficienza acquisita).

Laboratorio

Il laboratorio di microbiologia e virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova è costituito da diversi settori:

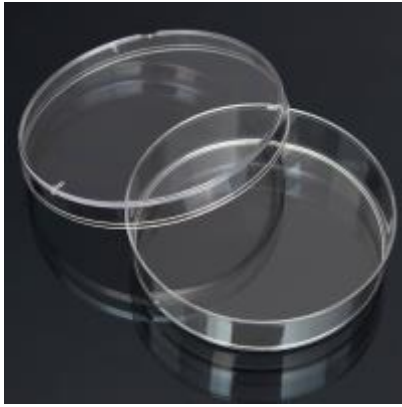
- Batteriologia;
- Sierologia;
- Virologia;
- Parassitologia;
- Biologia molecolare.

Batteriologia

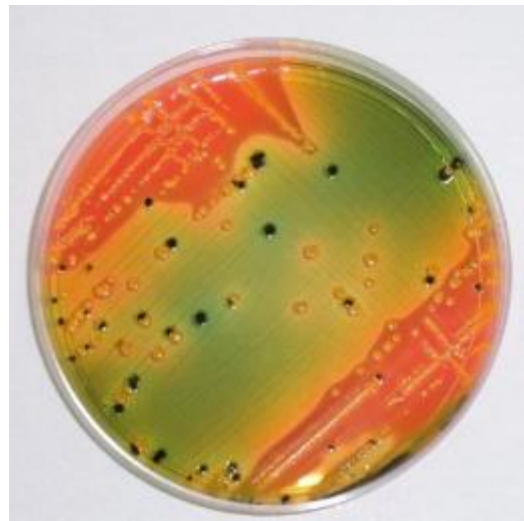
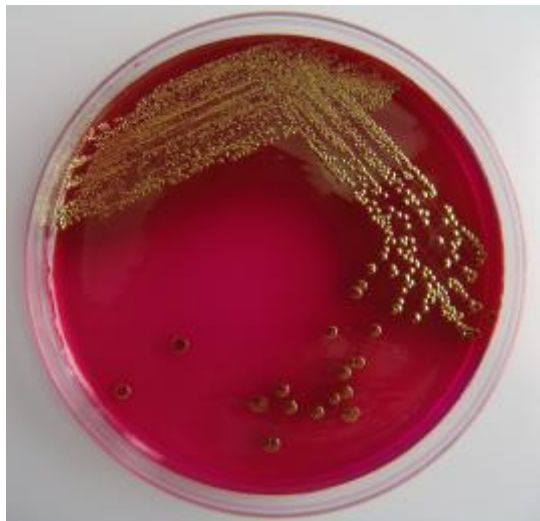
Settore suddiviso nelle seguenti aree:

- Emocolture;
- Respiratorio superiore e inferiore;
- Urine;
- Tamponi vaginali;
- Copro colture;
- Materiali vari (ferite, ascessi).

Quando arrivano i campioni nei vari settori bisogna controllare se contengono batteri, perciò viene prelevato del liquido dai campioni e lo si usa per seminarlo nelle capsule di Petri che presentano diversi terreni ciascuno adatto alla crescita di un gruppo di batteri, per esempio quelli anaerobi.



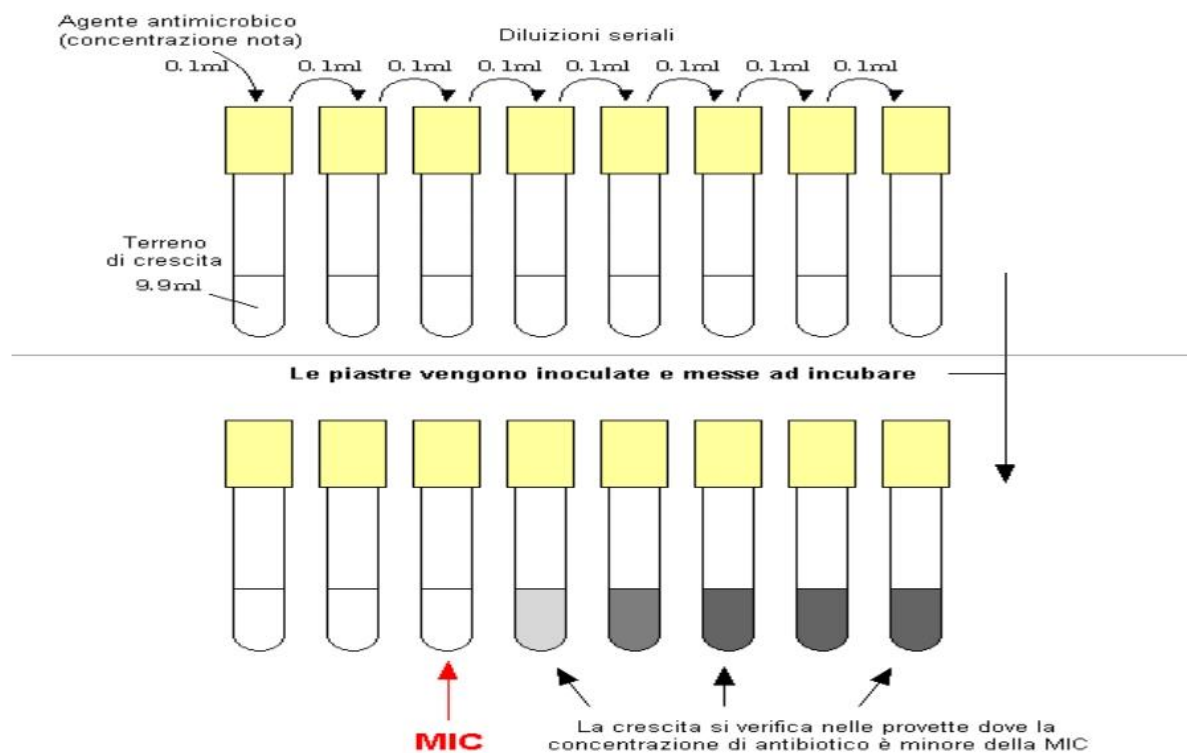
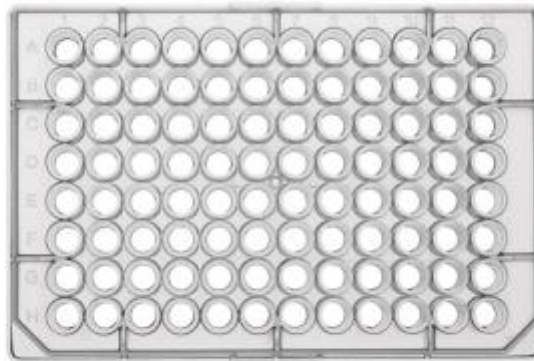
Una volta seminate le capsule si aspetta che crescano i batteri e in seguito si cerca di identificarli; se su una stessa capsula sono presenti più di tre batteri diversi è necessario isolarli al fine di riconoscerli più precisamente.



Infine si fa l'antibiogramma (esame che permette di valutare se un batterio è sensibile o meno a un determinato antibiotico) che può essere per:

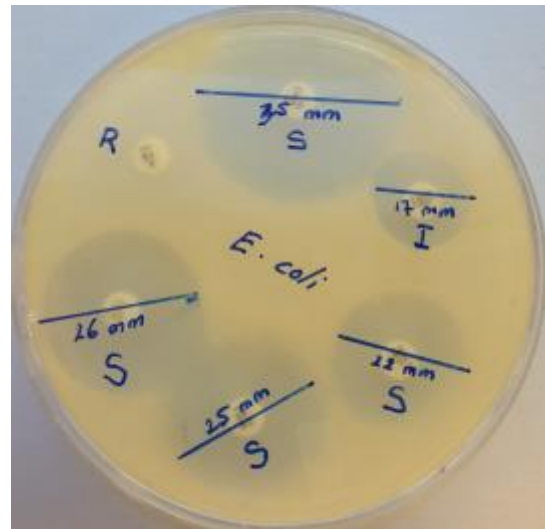
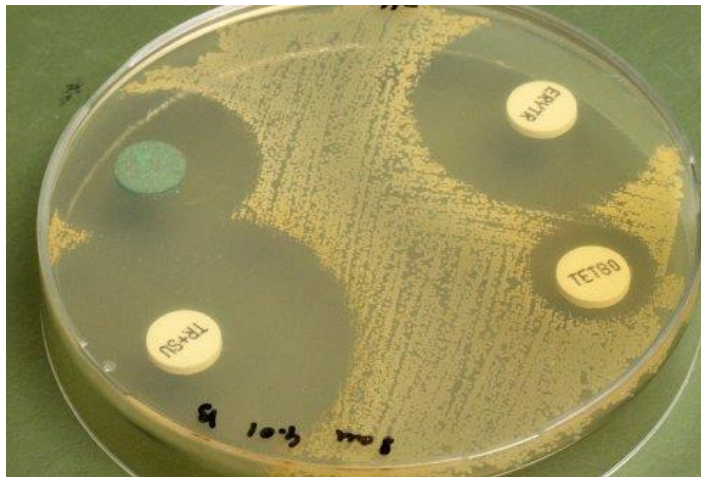
- Diluizione

Antibiogramma MIC, Minimal Inhibitory Concentration (Minima Concentrazione Inibente): il test è costituito da una serie di pozzetti nei quali si inserisce il campione da analizzare e una soluzione contenente una concentrazione variabile di antibiotico. In questo modo si va a valutare la minima concentrazione in grado di eliminare il batterio.



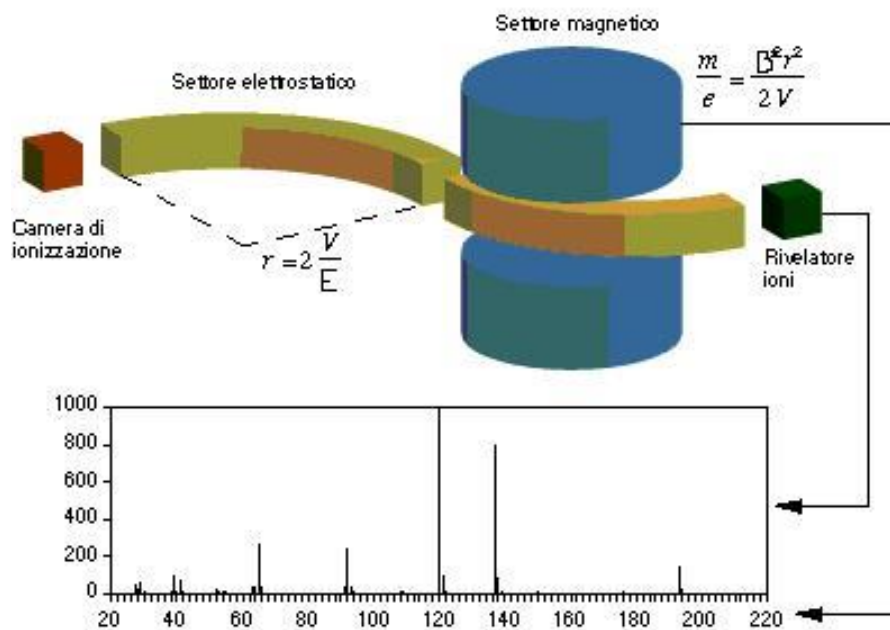
- Diffusione

Kirby-Bauer: si semina su una piastra di Petri il batterio del quale si vuole fare l'antibiogramma e poi sul terreno si applicano dei dischetti di diversi antibiotici. Per determinare la sensibilità all'antibiotico viene valutata l'ampiezza dell'alone che si forma attorno al dischetto.



Inoltre per un'identificazione batterica più accurata viene utilizzato lo **spettrometro di massa**, uno strumento che permette di misurare la massa molecolare di composti sconosciuti attraverso diversi passaggi:

1. La molecola di interesse, per poter essere analizzata, deve prima essere ionizzata, quindi ridotta a ioni a basso peso molecolare (10^8 Dalton) che possono essere sia positivi che negativi;
2. In seguito gli ioni vengono accelerati grazie ad un campo elettrico statico e assumono tutti una stessa velocità;
3. A questo punto gli ioni vengono proiettati in un analizzatore che li separa a seconda della loro massa molecolare;
4. Infine essi entrano in un rivelatore che ne identifica la massa.



Lo spettrometro è suddiviso in varie parti che operano sottovuoto, in questo modo viene impedito agli ioni di urtare le molecole presenti nell'aria:

1. Camera di ionizzazione/Sorgente

La sostanza da analizzare (analita) viene immessa nella sorgente per essere ionizzata e qui, secondo la ionizzazione per impatto elettronico che è la tecnica più utilizzata, viene fatta investire da un fascio di elettroni con un'elevata energia cinetica che urtano contro la sostanza e la ionizzano.

Altre tecniche di ionizzazione:

- FAB, Fast Atom Bombardment (ionizzazione con atomi veloci);
- MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (ionizzazione per desorbimento con laser, assistita da matrice);
- ESI, Electro Spray Ionization (ionizzazione elettrospray);
- APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization (ionizzazione chimica a pressione atmosferica).

2. Settore elettrostatico

Gli ioni appena formati possiedono un'energia cinetica, e quindi una velocità, che non è uguale per tutti. In questa parte dello spettrometro di massa le velocità degli ioni vengono uniformate in quanto alle estremità del settore, all'interno del quale passano gli ioni, viene applicata una differenza di potenziale che può variare da 6000 a 8000 V; gli ioni vengono dunque accelerati a spese del campo elettrico.

Il campo elettrico statico è conservativo dunque vale il principio di conservazione dell'energia:

$$\Delta U = \Delta K \quad (\text{differenza di energia potenziale} = \text{differenza di energia cinetica})$$

(con $\Delta U = Vq$, $\Delta K = \frac{1}{2}mv^2$, in quanto all'istante iniziale la particella è in quiete ed ha velocità iniziale nulla)

se l'energia potenziale diminuisce, quella cinetica aumenta insieme alla velocità;

il raggio della traiettoria percorsa dagli ioni accelerati è:

$$r = 2V/E \quad \text{dove } V = \text{potenziale, } E = \text{campo elettrico,}$$

la formula deriva dal fatto che durante il percorso le forze che agiscono sulla particella sono quella elettrica per azione del campo elettrico e quella centripeta a causa della traiettoria curvilinea, dunque:

$$F_e = F_c ;$$

$qE = mv^2/r$ dove q = carica, m = massa, v = velocità, da questa si ricava il raggio:

$$r = mv^2 / qE ;$$

$U = Vq$ quindi $V = U/q$ e di conseguenza $V = \frac{1}{2}mv^2/q$ che si può sostituire

sulla formula del raggio della traiettoria che diventa:

$$r = 2V/E.$$

3. *Analizzatore a deflessione magnetica*

È la componente dello spettrometro di massa che separa gli ioni in base al loro rapporto m/q grazie alla presenza di un campo magnetico B . Quando gli ioni entrano all'interno dell'analizzatore possiedono una determinata velocità v e su di loro agisce la Forza di Lorentz a causa del campo magnetico, $\vec{F}_L = q\vec{v} \times \vec{B}$; essa non compie lavoro sulla carica in quanto è perpendicolare allo spostamento perciò la velocità degli ioni rimane costante; c'è però una forza centripeta che provoca un'accelerazione dovuta al fatto che il vettore velocità non cambia in modulo ma solo in direzione. Infatti il moto compiuto da particelle cariche immerse in un campo magnetico è circolare uniforme; nell'analizzatore si sfrutta questo moto proprio per separare gli ioni a seconda della loro massa in quanto:

$F_L = F_C$ dove $F_L = q v B$ (Forza di Lorentz) e $F_C = mv^2/r$ (Forza centripeta),

$$q v B = mv^2/r \quad \text{da cui} \quad r = mv / Bq;$$

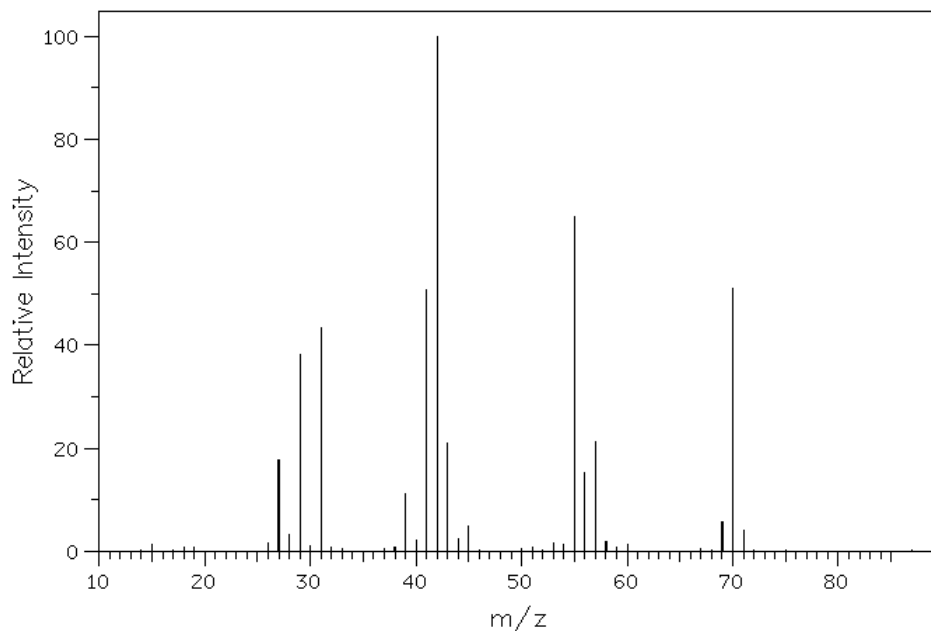
la velocità degli ioni è la stessa, il campo magnetico è uniforme e la carica è uguale per tutti gli ioni, perciò il raggio dipende esclusivamente dalla massa della particella carica, se questa aumenta anche il raggio aumenta. Dalla relazione ricavata ne consegue che solo alcuni ioni sono in grado di attraversare l'analizzatore che presenta un raggio fisso, così per permettere al maggior numero di ioni possibili di superare lo strumento il campo magnetico e il campo elettrico vengono fatti variare.

Esistono diversi tipi di analizzatori tra cui:

- Analizzatori a tempo di volo (TOF= time of flight);
- Analizzatore a quadrupolo;
- Analizzatore a trappola ionica;

4. Rivelatore

Una volta che gli ioni sono stati separati nell'analizzatore, vengono inviati al rivelatore in grado di trasformare in modo proporzionale la corrente ionica in corrente elettrica. Sono necessarie delle superfici che raccolgano gli ioni dove la loro carica venga neutralizzata sia per raccolta che per donazione di elettroni, in questo modo si verifica un trasferimento di elettroni e dunque un flusso di corrente che può essere amplificato e convertito nello spettro di massa; esso presenta in ascissa i valori del rapporto m/q e in ordinata l'abbondanza di ciascun ione e a seconda dei picchi si può arrivare alla formula chimica della sostanza analizzata.



Virologia

In questo settore si svolgono diverse attività di ricerca e di identificazione di virus:

- Ricerca dei genotipi (il genotipo è il profilo genetico di un organismo) di HCV, Hepatitis C Virus (virus dell'epatite C), ne esistono diversi in base alla zona geografica;
- Ricerca di CMV, CitoMegalovirus, un virus appartenente alla famiglia degli Herpesvirus (virus che possiedono la caratteristica di non abbandonare mai l'ospite dopo la prima infezione);
- Diagnostica di febbri estive come Zika (virus trasmesso attraverso la puntura di zanzare), West Nile (provocata da un virus presente negli uccelli selvatici e nelle zanzare);

- Coltura e isolamento di virus come il morbillo, HSV (Herpes Simplex Virus) che può provocare herpes labiali e genitali, VZV (Varicella Zoster Virus) il virus della varicella o del “Fuoco di Sant’Antonio”;
- Diagnosi di HIV, HCV e HBV, Hepatitis B Virus (virus dell’epatite B).

Diagnosi dell’HIV, Human Immunodeficiency Virus

Durante la diagnostica del virus viene fatto innanzitutto un controllo qualitativo e in caso di positività si passa a un controllo di tipo quantitativo; prima dunque si cerca la presenza o meno del virus nel paziente, e in seguito, se è presente, si controlla la carica virale, cioè quanto virus è presente nel plasma.

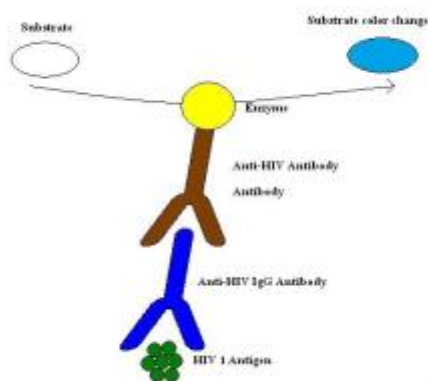
- **Controllo qualitativo**

Il primo test che viene fatto è l’**ELISA**, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (test di immunoassorbimento mediante anticorpi enzimadipendenti) con il quale si vanno a cercare gli anticorpi per il virus. Esso deve essere fatto dopo il “periodo finestra”, intervallo di tempo tra il contagio e la sieroconversione, ossia la comparsa degli anticorpi, che può durare dai 2 ai 6 mesi.

In una provetta vengono inseriti gli antigeni, cioè il virus, in seguito viene aggiunto il campione di plasma e se in quest’ultimo sono presenti gli anticorpi per l’HIV allora essi si legheranno all’antigene.

Un antigene è un qualsiasi agente estraneo che provoca una risposta immunitaria e dunque la produzione di anticorpi, proteine prodotte dai linfociti B durante una risposta immunitaria, in grado di legarsi all’antigene riconoscendolo e rendendolo visibile ai globuli bianchi.

Successivamente si inserisce un anticorpo secondario legato a un enzima e infine un substrato, cioè una sostanza in grado di cambiare colore se reagisce con l’enzima legato all’anticorpo. A questo punto se nella provetta si verifica un cambiamento di colore, significa che l’enzima ha catalizzato la reazione con il substrato, dunque l’anticorpo secondario si è legato all’anticorpo presente nel plasma, perciò la persona che si è sottoposta al test presenta il virus.



In caso di positività del test precedente per confermare l'infezione, dopo una serie di passaggi, si utilizza il metodo **Western Blot**.

1. Separare le proteine del virus: si utilizza la tecnica dell'elettroforesi su gel, ma prima di depositare le proteine nei pozzetti, dato che hanno strutture molto diverse e non hanno una carica uniforme, è necessario denaturarle, in modo che si presentino sotto forma di catene lineari, e aggiungere loro un detergente che si leghi agli amminoacidi mantenendo la proteina denaturata; inoltre, dato che il detergente è un polianione, esso conferisce loro una carica negativa uguale per tutte. A questo punto si applica l'elettroforesi su gel di poliacrilammide grazie alla quale le proteine virali vengono separate in base al loro peso molecolare.
La poliacrilammide è un polimero dell'acrilammide che può essere utilizzato una sola volta perché quando solidifica crea delle maglie molto strette, impedendo che la sostanza venga riportata alla situazione iniziale.
 - Il gel viene fatto solidificare in una vaschetta in cui è posizionato un pettine dentellato ad un'estremità in modo da formare dei pozzetti;
 - Si inseriscono le proteine precedentemente trattate nei pozzetti;
 - Si applica una differenza di potenziale alle estremità della vaschetta in modo che il polo negativo sia dalla parte dei pozzetti e quello positivo nell'estremità opposta; così facendo le proteine vengono attratte dal catodo e separate a seconda del loro peso molecolare in quanto maggiore è la loro massa molare minore è la strada che percorrono e viceversa;
2. Le proteine separate presenti sul gel di poliacrilammide vengono trasferite attraverso il metodo Western Blot su un foglio di nitrocellulosa, che presenta una carica positiva per attirare le proteine, inoltre sopra di esso viene posizionata della carta assorbente che per capillarità facilita il trasferimento delle proteine. In seguito il foglio viene tagliato a strisce;
3. Le strisce di carta vengono immerse in un campione di plasma: se in esso sono presenti gli anticorpi per il virus si andranno ad unire alle sue proteine;

4. Per evidenziare la presenza o meno degli anticorpi è necessario aggiungere un substrato e un anticorpo secondario coniugato a un enzima; questo è in grado di reagire con il substrato facendogli cambiare colore nel momento in cui l'anticorpo secondario si lega a quello primario unito a sua volta alla proteina virale;
5. In questo modo si possono identificare gli anticorpi nel plasma in quanto le bande colorate presentano gli anticorpi mentre le altre no.

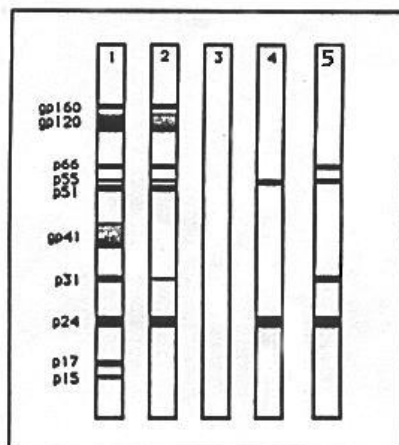
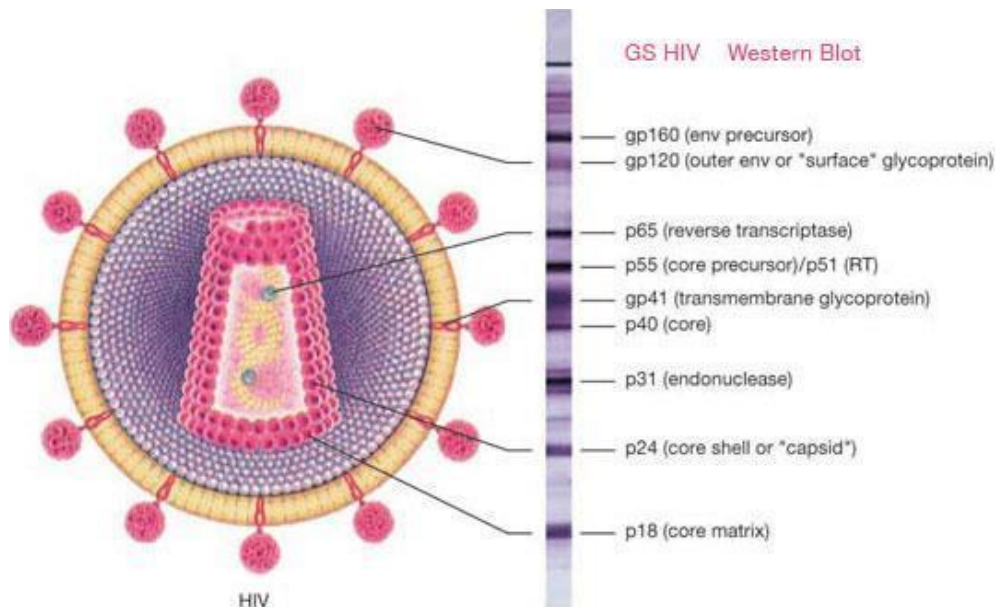
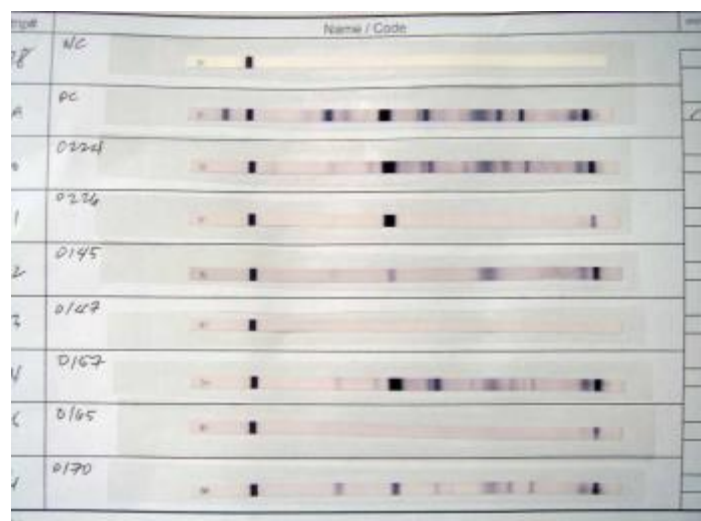


Figure:

Examples of reactions by an HIV-1 Western blot:

1. Positive control (strong)
2. Positive control (weak)
3. Negative control
4. Indeterminate profile
5. Indeterminate profile (highly suggestive)



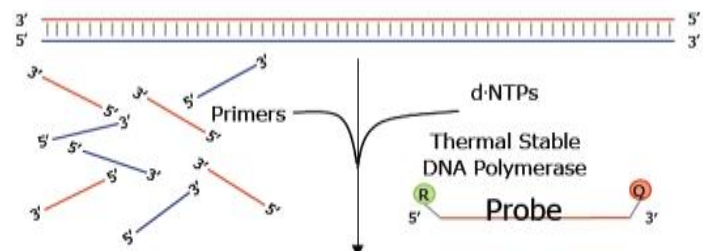
- **Controllo quantitativo**

Una volta confermata la positività del paziente bisogna controllare la carica virale, cioè quante copie di virus sono presenti nel sangue. Il controllo viene effettuato da un macchinario chiamato **Abbot Real Time HIV**, il quale:

- Estrae l'RNA dal plasma:
nei pozzetti contenenti il campione vengono inserite delle particelle magnetiche per catturare l'RNA virale, in seguito si lava la miscela per rimuovere le sostanze che non si sono legate alle particelle.
- Converte l'RNA in DNA complementare attraverso una trascrittasi inversa e lo amplifica grazie a una **PCR**, Polymerase Chain Reaction (reazione a catena della polimerasi):
innanzitutto l'RNA virale viene trasformato in cDNA dalla trascrittasi inversa, in seguito nei pozzetti vengono inseriti i nucleotidi e due brevi sequenze di DNA, i primers, necessari per l'amplificazione, e delle sonde, brevi sequenze di nucleotidi, necessarie per l'individuazione della regione env del virus, quella che decodifica l'enzima integrasi. La PCR si divide in tre fasi principali ripetute in modo ciclico:
 1. Melting (Denaturazione): il materiale genetico viene portato a una temperatura di 90° C circa affinché la doppia elica del DNA si denaturi;
 2. Annealing (Rinaturazione): viene abbassata la temperatura a circa 44° C per consentire ai primers di legarsi ciascuno a un filamento di DNA;
 3. Elongation (Allungamento): la temperatura viene nuovamente alzata fino a raggiungere i 72° C circa per permettere la polimerizzazione di un nuovo filamento grazie alla DNA polimerasi termoresistente (taq).

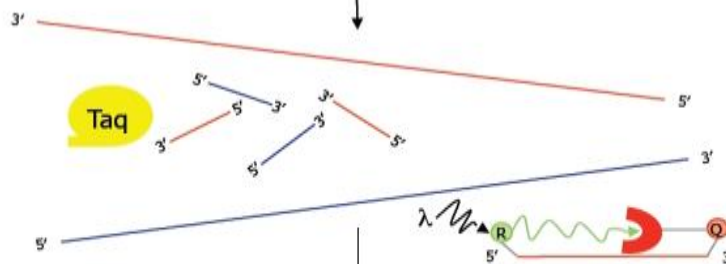
L'individuazione specifica della regione di DNA avviene durante la PCR, attraverso delle sonde, cioè delle piccole sequenze di DNA di circa 20-30 basi complementari al filamento di interesse, chiamate TaqMan; queste sonde sono composte da due parti: un "reporter", cioè un fluorocromo (sostanza che emette luce visibile di lunghezza d'onda più lunga di quella ricevuta) solitamente verde, all'estremità 5', e un "quencher", cioè un fluorocromo a energia minore solitamente di colore rosso, all'estremità 3'.

Finché la sonda rimane intatta l'energia emessa dal reporter viene assorbita dal quencher perciò non è possibile rivelare alcun tipo di segnale; quando però il filamento di interesse viene copiato, accade che la taq, incontrando la sonda, comincia a degradarla. In questo modo il quencher non è più in grado di assorbire l'energia emessa dal reporter e di conseguenza è possibile individuare un segnale fluorescente.



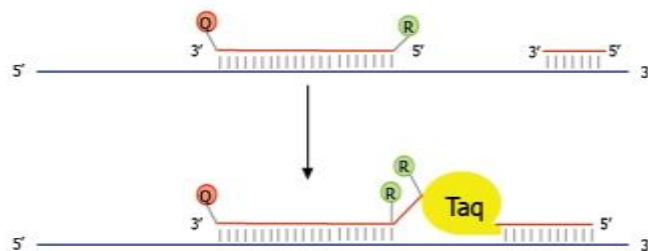
Add Master Mix and Sample

Reaction Tube



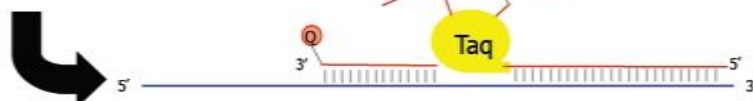
Denaturation

Annealing

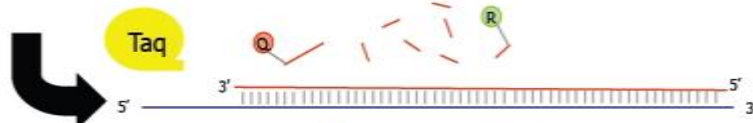


Extension Step

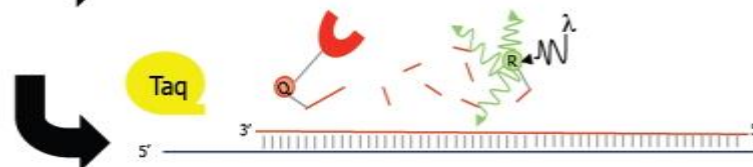
1. Strand Displacement



2. Cleavage



3. Polymerization Complete

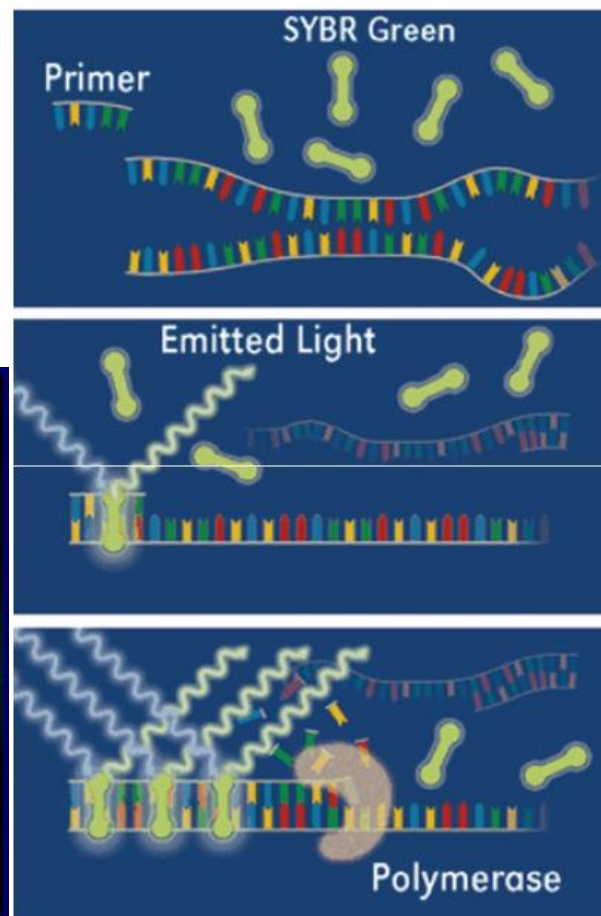
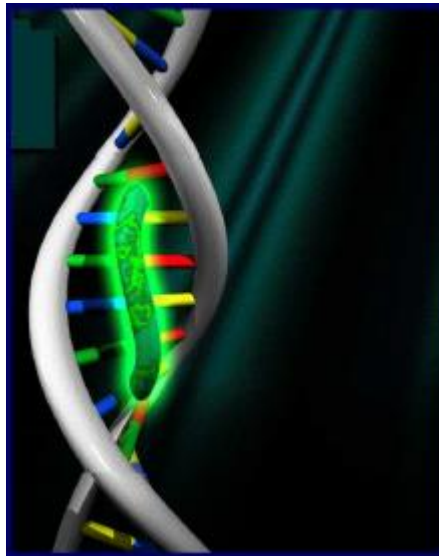


4. Detection

Al fine di individuare la quantità di RNA virale nel plasma, con lo stesso metodo, è possibile utilizzare altri tipi di sonde:

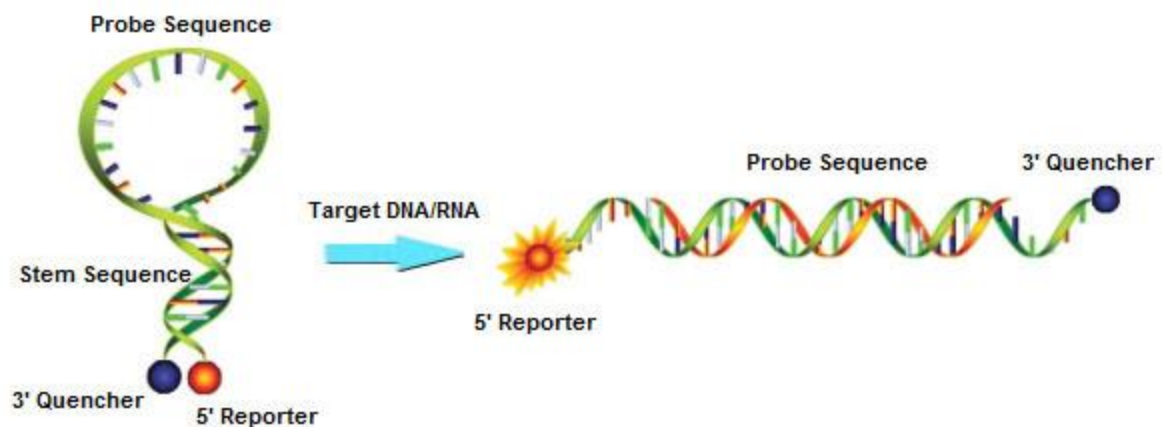
- Coloranti intercalanti che si legano in modo aspecifico al DNA:

SYBR GREEN che sviluppano la fluorescenza solo durante la fase di rinaturazione e allungamento.

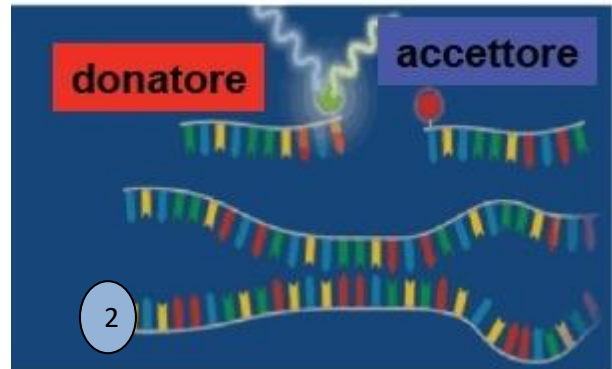
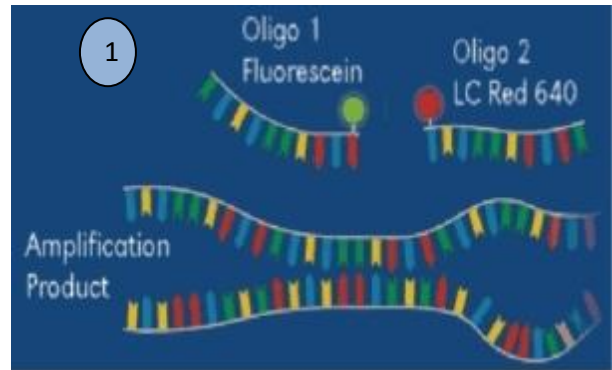
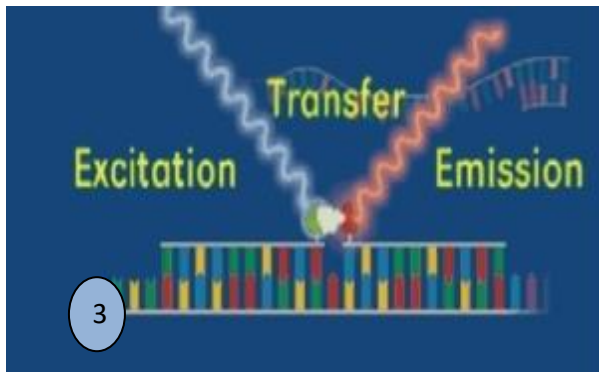


- Sonde a ibridazione, specifiche per la sequenza di interesse, marcate con molecole fluorescenti, oltre alle TaqMan ci sono:

MOLECULAR BEACONS che a differenza delle TaqMan non vengono distrutte durante l'amplificazione perciò possono reibridizzarsi durante il ciclo successivo



Sonde FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer (trasferimento di energia per risonanza): sono due diverse sequenze di DNA e ognuna di esse presenta un fluorocromo, solo quando le due sonde sono vicine può avvenire un trasferimento di energia che produce un segnale fluorescente.



- Determina la quantità di RNA virale presente nel campione tramite un software: durante la PCR viene amplificato anche un filamento di RNA che funge da controllo interno, necessario per costruire una curva di calibrazione standard. Il software analizza il segnale fluorescente emesso dal reporter, rivelando la quantità di DNA amplificato e producendo un'altra curva di calibrazione, elaborata grazie ai dati raccolti durante la PCR, che viene confrontata con quella standard.

Terapia: HAART, High Active Antiretroviral Therapy

Lo scopo della terapia è quello di bloccare la replicazione del virus andando a interagire con le proteine e i principali enzimi coinvolti nel processo.

Ciclo replicativo dell'HIV

L'HIV riconosce specificatamente la proteina CD4 delle cellule dei linfociti T4, l'interazione tra la proteina CD4 e la proteina di membrana gp120 permette alla proteina gp41 di perforare la membrana cellulare del linfocita in modo da fonderla con quella virale consentendo al virus di introdurre il proprio genoma. Una volta all'interno della cellula ospite la trascrittasi inversa sintetizza una molecola di DNA a partire dal filamento di RNA in tre fasi:

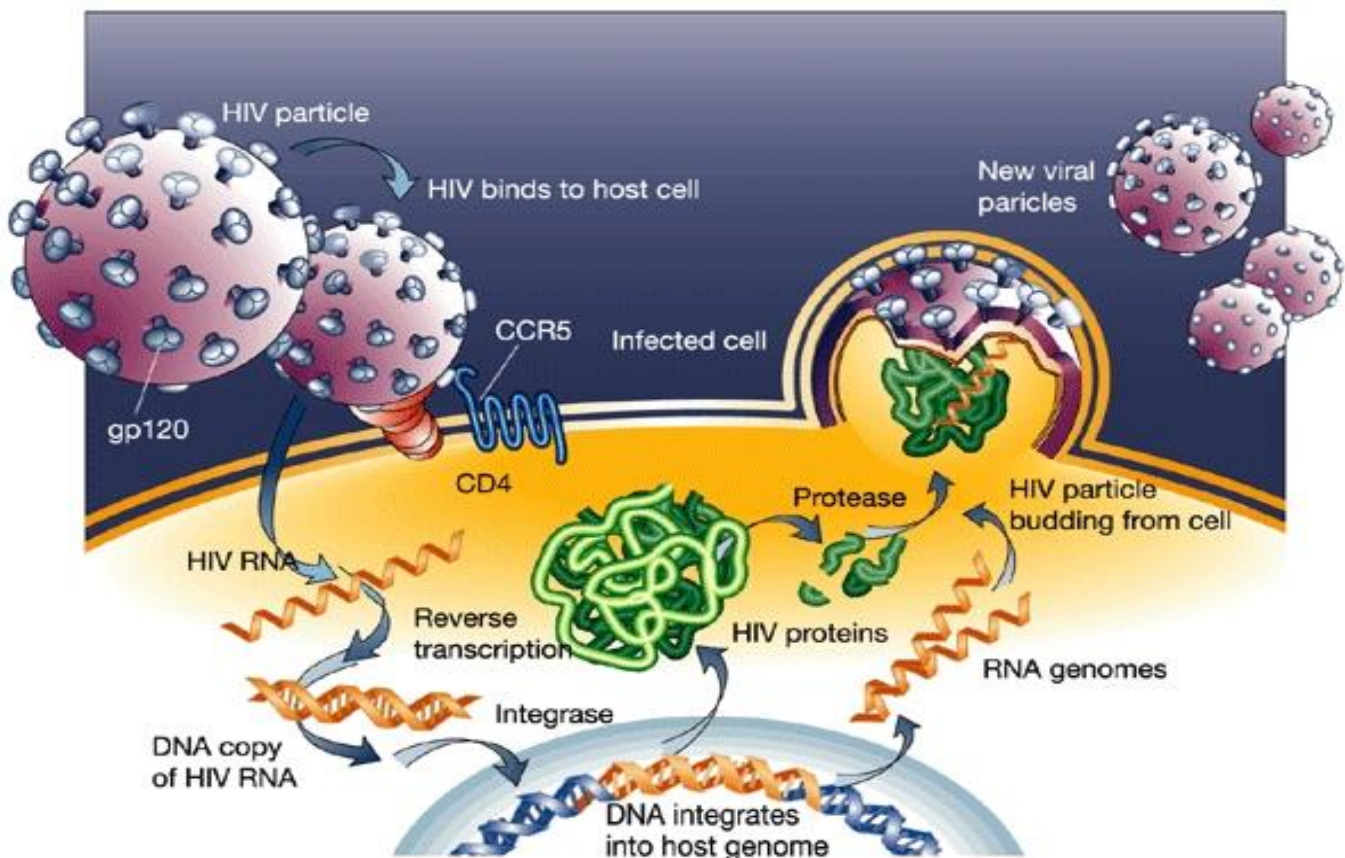
1. Sintetizza una catena di DNA complementare al filamento di RNA;

2. Degrada l'RNA originario;
3. Costruisce la seconda catena di DNA complementare a quella prodotta precedentemente.

Successivamente l'integrasi virale permette alla doppia catena di DNA di inserirsi all'interno del genoma del linfocita, in questo modo ogni volta che esso si riproduce duplicherà anche il DNA virale. La maggior parte dell'informazione genetica è contenuta nei geni gag, pol, env:

- Gag e env: codificano per le glicoproteine di membrana;
- Pol: codificano i tre enzimi fondamentali per la replicazione del virus: la trascrittasi inversa, l'integrasi e la proteasi.

Quando il genoma integrato si esprime produce filamenti di RNA identici a quelli da cui deriva il DNA attuale, e mentre una parte di questi funge da genoma virale, un'altra viene utilizzata per la sintesi di poliproteine inattive. Le poliproteine codificate dal gene env possono essere attivate grazie a un'idrolisi da parte di una proteasi della cellula ospite per formare le proteine della membrana virale esterna, mentre le poliproteine codificate dai geni gag e pol devono essere idrolizzate, e quindi attivate, solamente grazie alla proteasi virale al fine di produrre proteine di membrana ed enzimi.



Farmaci antiretrovirali

Come è stato detto precedentemente lo scopo di questi farmaci è quello di bloccare la replicazione del virus durante una fase specifica del suo ciclo di vita, impedendo che avvenga un processo essenziale per la sua riproduzione.

Classi di farmaci:

1. Modulatori dell'espressione del recettore cellulare CD4;
2. Inibitori di ingresso o di fusione;
3. Inibitori della trascrittasi inversa;
 - 3.a Inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa;
 - 3.b Inibitori nucleotidici della trascrittasi inversa;
 - 3.c Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa;
4. Inibitori della ribonucleasi H;
5. Inibitori dell'integrasi;
6. Inibitori della proteasi;

1. Modulatori dell'espressione del recettore cellulare CD4:

sono farmaci che agiscono sul recettore CD4 impedendo che il virus si leghi al linfocita T (globulo bianco che ha la funzione di eliminare le cellule infette da virus e di controllare l'attività degli altri globuli bianchi).

Ciclotriazadisulfonamide (CADA): impedisce l'ancoraggio del virus;

BMS-37806/KRH-1636: impediscono che la proteina del virus si leghi ai recettori delle CD4.

2. Inibitori di ingresso o di fusione:

Enfuvirtide o *Fuzeon*: amminoacido in grado di interagire con la proteina responsabile della fusione della membrana virale e cellulare per bloccarne l'azione.

3. Inibitori della trascrittasi inversa:
 - 3.a *Inibitori nucleosidici*: sono inibitori competitivi, cioè simulano il substrato, e si legano al sito attivo della trascrittasi inversa fungendo da terminatori della replicazione. Purtroppo nelle terapie a lunga durata producono mutazioni dei ceppi virali, facendoli diventare resistenti ai farmaci. Sono dei nucleosidi che nella posizione 2' o 3' non presentano il gruppo ossidrilico oppure questo è sostituito con un diverso gruppo funzionale, questa modificazione impedisce la formazione del legame fosfodiesterico col nucleotide successivo bloccando l'allungamento della catena.
 - 3.b *Inibitori nucleotidici*: sono inibitori competitivi, cioè simulano il substrato, e si legano al sito attivo della trascrittasi inversa fungendo da terminatori della replicazione. Sono dei nucleosidi che nella posizione 2' o 3' non presentano il gruppo ossidrilico oppure questo è

sostituito con un diverso gruppo funzionale, questa modificazione impedisce la formazione del legame fosfodiesterico col nucleotide successivo bloccando l'allungamento della catena. A differenza degli inibitori nucleosidici contengono un gruppo fosfato e al contrario di essi non provocano resistenza, inoltre possono essere utilizzati per la cura dell'epatite B;

3.c. Inibitori non nucleosidici: sono inibitori non competitivi, cioè molecole diverse dal substrato, che si legano al sito allosterico della trascrittasi inversa modificandone la forma e impedendole di agire. Questi farmaci non sono tossici per le cellule e non le danneggiano.

4. Inibitori della ribonucleasi H:

impediscono l'azione dell'enzima Ribonucleasi H il quale è in grado di staccare il filamento originario di RNA unito a quello complementare di DNA per permettere la formazione di un altro filamento di DNA complementare a quello già sintetizzato;

5. Inibitori dell'integrasi:

i dati riguardanti la struttura dell'enzima integrasi non sono completi perciò la maggior parte dei farmaci che agiscono sull'enzima sono attualmente in fase di sperimentazione clinica;

6. Inibitori della proteasi:

sono inibitori competitivi in quanto simulano il substrato, vengono dunque riconosciuti all'interno del sito attivo dell'enzima, e vanno a bloccare l'attività catalitica dello stesso enzima.

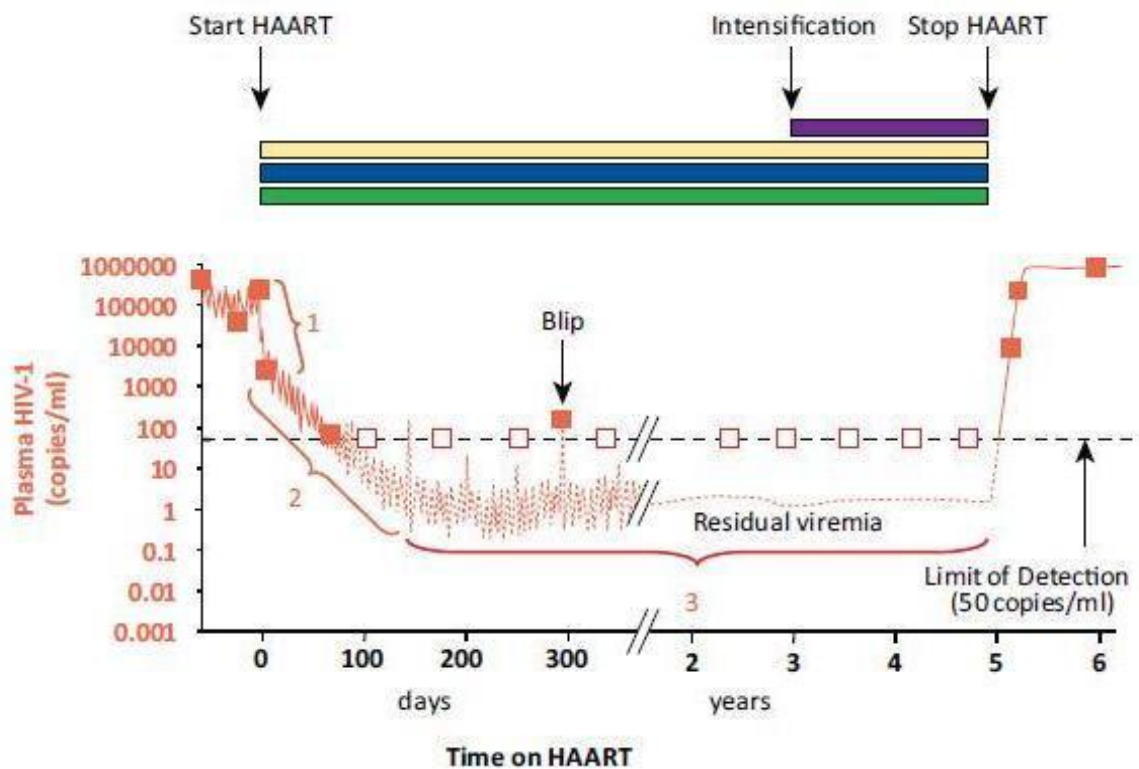
HAART, High Active Antiretroviral Therapy

La terapia consiste nella somministrazione di diversi farmaci ai pazienti infetti da HIV al fine di sopprimere la replicazione del virus e quindi di ridurre la carica virale. La HAART trasforma un'infezione che provoca la morte in una malattia cronica che può essere gestita e controllata. L'HIV venne scoperto nel 1981 e dopo intensi studi riguardanti la sua struttura e il suo meccanismo d'azione nel 1986 venne approvato il primo farmaco antiretrovirale. La HAART è stata descritta per la prima volta nel 1997 ed è nata grazie all'introduzione di due nuove classi di farmaci antiretrovirali: gli *inibitori della proteasi* e gli *inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa*. La combinazione di tre farmaci, di cui uno appartiene a una delle due nuove classi e gli altri due sono *inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa*, è in grado di ridurre i livelli di HIV al di sotto del limite di rilevazione dei test clinici (50 copie di RNA per ml di plasma). Nella terapia vengono combinati i vari farmaci a disposizione in modo da rendere la cura il più adatta possibile al paziente a cui viene sottoposta.

Tutti i farmaci usati nella HAART bloccano nuove infezioni, quindi diminuiscono i livelli di RNA virale nel plasma, in quanto agiscono sulle cellule infette che producono il virus.

Analisi riguardanti la velocità di decadimento virale dimostrano che la riduzione della presenza del virus nel plasma è composta da due fasi:

1. La prima è rapida perché la maggior parte del virus nel plasma è prodotto dalle cellule CD4 T attive, le quali impiegano meno di un giorno per dimezzare la loro emivita (= il tempo durante il quale producono il virus) (1);
2. La seconda, più lenta, è costituita dalla produzione di virus da parte di un'altra popolazione di cellule infettate da esso le quali possiedono un'emivita più lunga, da 1 a 4 settimane, sono dunque in grado di produrre il virus per un tempo maggiore. Inoltre queste cellule non sono ancora state identificate (2).



Estrapolando i dati dalla seconda fase si è pensato in un primo momento che la HAART potesse rimuovere l'infezione dopo 2-3 anni di trattamento. In seguito i ricercatori hanno scoperto la *latenza* dell'HIV.

Il problema della latenza

“Latency is defined as a silent or nonproductive state of infection of individual cells that can be reversed.”

Il genoma dell’HIV stabilmente integrato ma latente è presente nei linfociti T di memoria, a riposo; queste cellule non sono facilmente infettabili quindi un’ipotesi riguardo l’origine di questi *“latent reservoirs”*, serbatoi latenti, è che ogni tanto i linfociti T helper attivati vengono infettati nel momento in cui passano da uno stato attivo a uno di riposo che non permette l’espressione genica del virus. Alcuni studi mostrano che tutti i pazienti sotto la terapia HAART presentano i linfociti T latenti infettati dall’HIV e che se attivati possono iniziare a produrre il virus.

Nonostante la terapia sia efficace il numero di queste cellule di memoria infettate rimane costante per tutto il tempo. Il processo di proliferazione omeostatica (processo attraverso il quale il sistema immunitario mantiene un numero adatto di linfociti) inoltre permette di mantenere costante il pool di cellule della memoria T in questo modo però, se le stesse cellule sono state infettate dall’HIV, contribuisce alla stabilità dei serbatoi latenti.

Oltre alla carica virale latente nei linfociti T a riposo, sono state individuate tracce di virus nel plasma di quasi tutti i pazienti sotto HAART. La viremia residua non proviene dalla replicazione del virus ma più probabilmente dal rilascio di esso da parte delle cellule infettate prima dell’inizio della terapia. Ci sono diverse prove a favore di questa ipotesi:

1. L’esperienza clinica ha dimostrato che i pazienti che mantengono una carica virale al di sotto delle 50 copie per ml non sviluppano resistenza ai farmaci; questo significa che i farmaci non vanno a colpire le cellule infettate attive che potrebbero dunque sviluppare resistenza ad essi, ne consegue che la carica virale residua non è data dalla replicazione del virus all’interno delle cellule attive;
2. Ulteriori studi hanno verificato che anche se si intensifica la terapia aggiungendo altri farmaci antiretrovirali non si verifica una diminuzione della quantità di viremia residua;
3. Studi filogenetici hanno mostrato che i virus residui nel plasma non presentavano un’evoluzione genomica neanche durante i *“blip”*, i picchi, quando la viremia transita tra le 50 e le 200 copie per ml, perciò anche in questo caso significa che la carica virale residua non proviene dai virus prodotti dalle cellule attive.

In aggiunta alle cellule T a riposo diversi studi hanno dimostrato che esisterebbe un secondo serbatoio per il virus costituito da un altro gruppo di cellule in grado di proliferare dopo l’infezione, ma che attualmente non è ancora stato individuato.

Nel trattamento del virus HIV sono stati fatti notevoli passi avanti anche se non esiste ancora una cura per eliminare completamente l’infezione. Gli studi si stanno concentrando sul problema della latenza per identificare nuovi bersagli al fine di riattivare il virus latente e di poterlo sopprimere.

Bibliografia

Laboratorio:

- Hospital antibiogram: a necessity, S. Joshi, Indian Journal of Medical Microbiology, 2010;
- Genetic Characterization of a Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus isolate from the Respiratory tract of a patient in a University Hospital in Northeastern Iran, A. Azimian, S. A. Havaei, H. Fazeli, M. Nadei, K. Ghazvini, S. M. Samiel, M. Soleimani, S. N. Peerayeh, Journal of Clinical Microbiology, 2012;
- Mass Spectrometry in Biology, J. R. Yates, Nature, 2001;
- Università degli Studi di Salerno, Facoltà di Farmacia, Corso di Metodi fisici in chimica organica, Spettrometro di Massa, G. Bifulco, 2005;
- Principi di analisi farmaceutica, V. Cavrini, V. Andrisano, Esculapio, 2013;

Diagnostica dell'HIV:

- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a practical tool for rapid diagnosis of viruses and other infectious agents, R. H. Yolken, Yale Journal of Biology and Medicine, 1980;
- Frequency, Causes, and New Challenges of Indeterminate Results in Western Blot Confirmatory Testing for Antibodies to Human Immunodeficiency Virus, M. Guan, Clinical and Vaccine Immunology, 2007;
- Western Blot: Technique, Theory, and Trouble shooting, T. Mahmood, P. C. Yang, North American Journal of Medical Sciences, 2012;
- A New Real-Time Quantitative PCR for Diagnosis and Monitoring of HIV-1 Group O Infection, M. Gueudin, M. Leoz, V. Leuè, F. De Oliveira, A. Vessière, A. Kfutwah, J.C. Plantier, Journal of Clinical Microbiology, 2012;
- Real time quantitative PCR, C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, P. M. Williams, Genome Research, 1996;

Terapia: HAART, High Active Antiretroviral Therapy

- CADA inhibits human immunodeficiency virus and human herpesvirus 7 replication by down-modulation of the cellular CD4 receptor, K. Vermeine, Y. Zhang, K. Princen, S. Hatse, M. F. Samala, K. Dey, H. J. Choi, Y. Ahn, A. Sadoma, R. Snoeck, G. Andrei, E. De Clercq, T. W. Bell, D. Schols, Virology, 2002;
- Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche, Nuovi Approcci ad Inibitori Peptidomimetici dell'HIV-proteasi, dottorando P. Campaner, coordinatore G. Pitacco, relatore F. Benedetti, 2007;
- Homeostatic Proliferation Fails to Efficiently Reactivate HIV-1 Latently Infected Central Memory CD4+ T Cells, A. Bosque, M. Famiglietti, A. S. Weyrich, C. Goulston, V. Planelles, PLOS Pathogens, 2011;
- Developing Strategies for HIV-1 Eradication, C. N. Durand, J.N. Blankson, R. F. Siciliano, Cell Press, 2012;

Sitografia

- www.epicentro.iss.it , sito messo a punto dal Centro nazionale di epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute dell'Istituto superiore di sanità;
 - <http://www.epicentro.iss.it/problemi/westNile/westNile.asp>;
 - <http://www.epicentro.iss.it/argomenti/zika/zika.asp>;
 - <http://www.epicentro.iss.it/problemi/citomegalovirus/citomegalovirus.asp>;
 - <http://www.epicentro.iss.it/temi/ist/epid.asp>;
- www.popsci.it , sito dell'edizione italiana della rivista americana Popolar Science;
 - <http://www.popsci.it/chi-blocca-meglio-gli-odori-cotone-o-poliestere-2.html> (immagine);
- www.biomol.altervista.org , sito dell'unità di studio di Biologia molecolare dell'emostasi del dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare dell'università degli studi di Ferrara;
 - http://biomol.altervista.org/pcr_quantitativa.html;
- www.biotec.uniba.it , sito dell'università di bari;
 - http://www.biotec.uniba.it/area_docenti/documenti_docente/materiali_didattici/147_lezione9-real_time.pdf;
- <https://www.nih.gov/> , sito di un'agenzia di ricerca biomedica che fa parte del Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti;
 - https://www.nigms.nih.gov/education/life-magnified/Pages/11B_hiv.aspx (immagine).