

Notizie di base su HIV e sulla diagnostica di laboratorio dell'infezione

Highlights on HIV and laboratory diagnosis

M. PISTELLO, M. BENDINELLI

Sezione di Virologia e Centro Retrovirus, Dipartimento di Biomedicina, Università di Pisa

PAROLE CHIAVE. — Lentivirus - HIV - AIDS

KEY WORDS. — *Lentivirus - HIV - AIDS*

HIV è un lentivirus. I lentivirus appartengono alla famiglia *Retroviridae* il cui carattere distintivo è il fatto di possedere il genoma ad RNA che, per potersi replicare, deve diventare DNA.

Quindi si ha un andamento dell'informazione genetica in senso retrogrado, da cui il nome «retrovirus». L'RNA genomico, ad opera dell'enzima DNA polimerasi RNA-dipendente nota come «trascrittasi inversa», viene trascritto in una copia di DNA, che viene poi circolarizzata ed integrata nel genoma della cellula ospite. A questo punto il genoma virale integrato (definito provirus), diventa patrimonio della cellula ospite e, in quanto tale, può rimanere silente ed essere trasmesso alle cellule figlie come un qualsiasi gene cellulare o può essere trascritto in RNA messaggeri ed in RNA genomici progenie per azione degli stessi enzimi che fanno esprimere il DNA proprio della cellula.

Nell'ambito dei retrovirus si distinguono tre generi principali: oncovirus, spumavirus e lentivirus. Nell'uomo gli oncovirus sono due, si chiamano HTLV e sono virus associati a delle forme di leucemia piuttosto rare nel nostro paese. Gli spumavirus sono virus che conosciamo poco nelle loro potenzialità patogene. I lentivirus devono invece il nome alla lenta progressione dell'infezione e della malattia. Sotto il profilo patogenetico, HIV è molto simile ai virus della immunodeficienza della scimmia e del gatto, che pertanto rappresentano importanti modelli animali di riferimento, mentre è abbastanza distinto dagli altri lentivirus che non provocano gravi deficit immunologici.

Il virione è una particella di circa 100 nanometri ed è caratterizzato da un pericapside, cioè da un involucro esterno costituito da lipidi derivati dalle membrane cellulari e da proteine codificate dal virus. All'interno c'è un capsido che, a sua volta, racchiude un nucleotide che in sezioni sottili, osservate al microscopio elettronico, ha forma di «sbarretta» corrispondenti ad una struttura tridimensionale a tronco di cono.

La forma del nucleotide è importante perché rappresenta uno dei caratteri morfologici distintivi dei lentivirus.

Alla sua superficie esterna il pericapside presenta delle proiezioni proteiche che contengono gli antigeni di superficie del virus e le strutture chiamate antirecettori, con i quali il virus si attacca ai recettori cellulari.

Le molecole virus-codificate presenti nel pericapside sono le glicoproteine gp120 e gp41 (il numero rappresenta il peso molecolare espresso in migliaia di daltons). Il virione possiede poi tutta una serie di proteine interne. La principale è la proteina p24, che costituisce il capsido ed è la molecola quantitativamente più rappresentata dal virione. Ci sono poi altre proteine che contribuiscono alla struttura del virus. Nel nucleotide sono contenute due copie del genoma ed un certo numero di molecole dell'enzima transcriptasi inversa e di altri enzimi, la cui presenza è indispensabile alla replicazione del virus in quanto non sono presenti nelle cellule enzimi con attività analoga. Come in tutti i virus, le strutture che racchiudono il genoma sono necessarie alla protezione del genoma stesso da fattori che, all'interno dell'organismo, sono costituiti essenzialmente da ribonucleasi e, all'esterno, da agenti fisici e chimici. Tutto ciò che consegue dall'ingresso del virus nell'ospite e le patologie che ne derivano, è legato naturalmente alla presenza e all'integrità funzionale del genoma virale. Si conoscono con precisione tutti i nucleotidi che compongono il genoma virale, il quale è stato sequenziato in centinaia di isolati virali diversi. Conosciamo piuttosto bene anche l'organizzazione funzionale del genoma virale. Esistono tre regioni genetiche principali: *gag* (da group antigen) che codifica per le proteine interne del virione (che, in quanto tali, sono le più conservate), *pol* (da polimerasi) che codifica gli enzimi necessari alla replicazione virale, fra cui la transcriptasi inversa, ed *env* (da envelope, involucro) che codifica per le glicoproteine di superficie. Accanto a questi geni principali, c'è poi tutta una serie di geni accessori che codificano per proteine con importanti funzioni regolatorie che, oltre a modulare la replicazione di HIV, sono probabilmente alla base della lunga latenza della malattia, della possibilità cioè del virus di persistere a lungo con una replicazione moderata. Oltre alle

funzioni regolatorie esercitate dai geni accessori esistono, alle estremità del provirus, altre zone che influenzano il livello di replicazione del virus. Tali regioni, note come LTR (long terminal repeats, perché molto simili tra loro), contengono attivatori, promotori ed una serie di altre sequenze genetiche suscettibili all'azione di varie sostanze quali, per esempio, alcune linfocine e citochine prodotte nel corso dell'attivazione del sistema immunitario. Il genoma di HIV quindi presenta sistemi di regolazione molto fini, simili a quelli che esistono nei genomi delle cellule superiori. Ciò permette al virus di convivere a lungo con il genoma delle cellule che infettano, dando luogo ad un parassitismo genetico spinto alle estreme conseguenze.

Come penetra nelle cellule il virus HIV? Il recettore di gran lunga più importante è la molecola chiamata CD4 (da «cluster of differentiation» di tipo 4), che è presente su linfociti T, macrofagi e vari altri tipi cellulari. È stato scoperto fin dal 1984, quando si vide che incubando le cellule con anticorpi che si legavano al CD4, era possibile impedire al virus di entrare nelle cellule. Accanto a questa via principale di ingresso, esistono probabilmente altre vie, alcune ipotizzate ed altre dimostrate, come la fagocitosi e l'endocitosi tramite recettori per le porzioni Fc delle immunoglobuline. È chiaro che quest'ultima forma di endocitosi è valida non per il virus come tale ma per il virus complessato con anticorpi. Un altro marcatore di superficie presente in alcune cellule e descritto in letteratura come ulteriore o alternativo recettore per HIV è il CD26, ma il suo significato reale è ancora controverso. Una volta all'interno della cellula, il capsido virale si disgrega e, ad opera della trascrittasi inversa, si ha la trascrizione dell'RNA virale in una doppia elica di DNA, che si circularizza, entra nel nucleo e viene integrata nel genoma della cellula. Successivamente, il complesso di enzimi che producono messaggeri cellulari, sintetizzano anche RNA virale, il quale in parte costituirà il genoma dei nuovi virioni, in parte verrà utilizzato come RNA messaggero virale per produrre le proteine virali.

La maturazione del virus avviene per un processo spontaneo di automontaggio, in cui non sono coinvolti enzimi, ma è probabilmente dovuto alla configurazione ed all'affinità dei vari componenti proteici. Al corretto assemblaggio contribuiscono anche le glicoproteine gp120 e gp41 che, dopo la sintesi, si inseriscono sulla membrana plasmatica e, con un meccanismo non ben definito, avvicinano il capsido virale alla superficie della cellula dalla quale, progressivamente, questo comincia a protrudere. L'evento finale è la fuoriuscita dalla cellula della particella virale attraverso un processo di gemmazione, che può avvenire a vari livelli, ma che in linea di massima avviene sulla membrana plasmatica. In questa fase, quindi, il virione acquisisce l'involucro esterno, costituito dalla membrana plasmatica e dalle glicoproteine di superficie del virus, gp120 e gp41.

Questo tipo di replicazione rende difficile trovare bersagli per la terapia, alcuni però sono stati individuati ed hanno permesso di sviluppare alcuni farmaci soddisfacenti. In gran parte si tratta di inibitori che agiscono a livello della sintesi degli acidi nucleici virali ma, per la notevole similarità dei processi molecolari virali con quelli cellulari, tali composti risultano piuttosto tossici. Una delle principali caratteristiche di HIV è il continuo riassetto nucleotidico del gene *env*. Il risultato è una elevata variabilità nella sequenza aminoacidica delle glicoproteine di superficie. Tale fenomeno è noto da tempo e si osserva in tutti i virus, ma nei lentivirus è particolarmente pronunciato. Il riassetto genomico non è omogeneo, ma è localizzato principalmente in alcune porzioni di *env*, definite regioni variabili o, per zone con frequenza di mutazione molto elevata, ipervariabili. Altre regioni invece sono costanti poiché, presumibilmente, codificano per segmenti aminoacidici essenziali al mantenimento della struttura proteica tridimensionale o coinvolti nell'interazione con il recettore cellulare e, come tali, hanno un grado di variabilità più limitato. Le mutazioni nel gene *env* non compromettono la funzionalità biologica del virus, che mantiene la sua capacità replicativa, ma comporta notevoli problemi al sistema immunitario che deve continuamente aggiustare la mira per organizzare un sistema di difesa efficace contro la nuova variante virale.

La plasticità antigenica del virus è ampiamente dimostrata sia in senso geografico, sia in uno stesso individuo. In base all'organizzazione antigenica di HIV sono stati definiti otto gruppi diversi (più propriamente definiti «cluster»), i cui componenti, all'interno di ogni singolo gruppo, sono identificabili con uno o più anticorpi specifici. La prevalenza dei «cluster» risente della localizzazione geografica. Ciò è importante oltre che dal punto di vista epidemiologico, anche per lo sviluppo di vaccini, che dovranno essere adattati all'assetto antigenico prevalente nella regione geografica considerata.

L'ipotetico vaccino dovrà comunque essere multivalente e, grazie al costante monitoraggio della situazione epidemiologica, modificato nel tempo, un po' come avviene per il virus influenzale.

L'insorgenza di nuove varianti virali è da attribuirsi principalmente a due eventi sequenziali indipendenti: l'errata trascrizione del genoma virale ad opera della transcriptasi inversa e l'elusione dei meccanismi di difesa. La risposta immunitaria infatti contiene l'infezione, ma allo stesso tempo fa emergere le varianti meno sensibili al sistema immunitario. La progressione dell'infezione è quindi il risultato della continua sfida di HIV al sistema immunitario. Nell'infezione primaria c'è una fase asintomatica che consiste in un sostanziale equilibrio tra il virus e la cellula, tranne per alcuni momenti in cui il virus, essendo variato geneticamente, può moltiplicarsi più floridamente, poi viene nuovamente contenuto, poi emerge un'altra variante, e così via, fino a che le difese immunitarie decadono per la

caduta dei CD4 sotto la soglia minimale per un sufficiente funzionamento del sistema immunitario. A questo punto le potenzialità del sistema immunitario sono esaurite, quindi il virus si può replicare tranquillamente e causare la malattia conclamata, il cui sintomo più evidente è la drammatica suscettibilità alle superinfezioni da agenti patogeni opportunisti.

I tipi cellulari più importanti che vengono attaccati dal virus sono i linfociti T, le cellule della serie monocito-macrofagica, le cellule dendritiche e le cellule della microglia. La replicazione del virus in queste cellule non è uguale perché le cellule sono diverse tra loro e perché il virus si comporta diversamente nei diversi tipi cellulari. I geni regolatori (*rev*, *tat*, *vif*, ecc.), hanno funzioni diverse nei linfociti CD4 e nei macrofagi e questo si può riflettere nella quantità del virus che viene prodotto e nelle modalità con cui questo viene liberato dalle cellule. Nei linfociti CD4 positivi il virus matura e gemma prevalentemente sulla membrana plasmatica. Nei macrofagi invece tende ad aggregarsi all'interno ed a maturare a livello delle membrane che costituiscono le vescicole cellulari. In effetti la replicazione del virus nei linfociti è molto più florida rispetto a quella nei monociti macrofagi. Tuttavia il contributo dato da queste cellule nella patogenesi dell'infezione, è fondamentale, poiché rappresentano il luogo in cui il virus si nasconde ed uno dei principali mezzi di disseminazione nell'organismo. Il livello di replicazione virale dipende oltre che dal tipo anche dallo stato fisiologico in cui si trova la cellula. Lo stesso linfocita produce poco virus in condizioni di riposo ma, se attivato, il livello di produzione aumenta enormemente. Il virus possiede quindi dei sistemi di regolazione che rispondono sia agli stimoli propri, sia a quelli della cellula ed il processo di replicazione è il risultato della sommatoria di queste interazioni. L'assenza di replicazione virale è definita «latenza virologica». È la situazione tipica della fase asintomatica della malattia in cui il paziente, per l'assenza di sintomi clinici manifesti, si trova in uno stato di apparente benessere. Questo stato è definito «latenza clinica». Attualmente però si ritiene che non esista una vera e propria latenza virologica, in quanto si è visto che ci saranno livelli maggiori o minori di espressione, ma il virus si replica continuamente.

L'effetto più vistoso del virus sulle cellule è la formazione dei sincizi, cellule multinucleate che derivano dalla fusione di numerose cellule fra di loro. L'effetto sinciziogeno è molto meno evidente con i macrofagi, in cui è diversa anche l'entità delle alterazioni cellulari conseguenti alla replicazione. Si formano infatti sincizi più piccoli e più rari ma che tuttavia contengono numerose particelle virali. Il virus può provocare anche la lisi delle cellule. Però, sia l'effetto sinciziogeno che quello litico non spiegano la deplezione dei linfociti CD4 che è la causa principale della patologia da HIV. Per questo motivo sono state avanzate tante ipotesi e quella che

attualmente ha una certa rilevanza, è l'apoptosi, cioè morte programmata. Tutte le nostre cellule hanno una vita definita ed al termine del ciclo vitale si attivano generalmente degli enzimi endocellulari che provocano una serie di alterazioni morfologiche e funzionali caratteristiche che conducono la cellula ad una sorta di suicidio biologico. Il virus riuscirebbe ad accelerare questo processo.

Come si effettua la diagnosi di infezione da HIV?

Mediante ricerca dell'agente eziologico, o ricercando la risposta immunitaria verso l'agente infettivo. Il virus HIV invade tutto l'ospite, perché infetta cellule circolanti e quindi si ritrova in tutti i tessuti. È stato isolato da parecchi fluidi corporei, dal sangue, dal plasma, dal liquor, dalla saliva, dal liquido lacrimale, ecc.. L'isolamento è facile anche se indaginoso e si può isolare il virus praticamente dalla totalità dei soggetti sia asintomatici che in fase di ARC o di AIDS; sia partendo dai leucociti che dal plasma. Molto spesso si ricorre, anche in alternativa all'isolamento virale, alla tecnica detta reazione polimerasica a catena o PCR (polymerase chain reaction), che mira a dimostrare una porzione del genoma virale mediante amplificazione molecolare. È un metodo rapido, molto sensibile e specifico, che si può eseguire su porzioni diverse del genoma virale, ma deve essere effettuato molto correttamente e con particolari precauzioni per ridurre al minimo la probabilità di falsi positivi. Non è ancora stata stabilita una procedura standard di esecuzione del saggio ed i kit disponibili commercialmente non sono molto affidabili. Almeno per il momento il solo risultato della PCR va quindi interpretato con molta cautela. Sia l'isolamento virale che la PCR permettono di rilevare il virus anche in soggetti che non si sono ancora sieropositivizzati. La sieroconversione infatti richiede qualche settimana, quindi c'è un primo periodo in cui il virus è presente e l'individuo è infettante ma ancora sieronegativo (periodo finestra dei trasfusionisti).

La diagnosi può essere effettuata anche con metodi sierologici e, poiché per quanto ne sappiamo, il virus persiste in tutti i soggetti che si infettano, è sufficiente dimostrare una risposta immunitaria anti-HIV per dire che l'individuo è infettato. In altre parole, basta il semplice riscontro di anticorpi che vengono normalmente ricercati con sistemi immunoenzimatici (tecniche ELISA), che notoriamente sono tra i più sensibili e rapidi tra i metodi sierologici attualmente disponibili. La diagnosi con l'ELISA va sempre confermata, ed il saggio sul quale ormai sono tutti concordi come test di conferma, è il western blotting in cui gli antigeni virionici sono separati fisicamente su un supporto solido ed è possibile perciò distinguere gli anticorpi sulla base della risposta verso i singoli antigeni. Il problema è il periodo di latenza della comparsa degli anticorpi che, nel caso degli anti-p24, è in genere di 3-4 settimane, mentre è di 4-8

settimane per quelli diretti verso le altre proteine virali. La sierologia è quindi il sistema di elezione per la diagnosi, è il più rapido, ma non vede le prime settimane dell'infezione e ciò rappresenta un grave problema per le trasfusioni di sangue e per la trasmissione parenterale del virus.

Un ulteriore approccio diagnostico, che però ha scarso valore per l'accertamento di infezione, è la ricerca degli antigeni virali (normalmente la p24), che può essere dimostrata nel sangue nelle fasi iniziali dell'infezione, poi saltuariamente ed infine continuativamente nelle fasi finali. La sua presenza è quindi ritenuta un indice di progressione della malattia. Questo metodo non è molto usato nella diagnosi di infezione per la sua scarsa sensibilità anche se, ultimamente, è stata aumentata con trattamenti che dissociano i complessi antigeni-anticorpo.

Una corretta applicazione dei metodi diagnostici permetterà un più efficace controllo della diffusione dell'infezione da HIV, mentre è sperabile che l'impiego di tecnologie sperimentali nell'ambito della ricerca porti all'ulteriore affinamento delle procedure diagnostiche. La ricerca dovrà anche fornire informazioni più precise sui meccanismi patogenetici e consentire un arricchimento dell'armamentario terapeutico nonché lo sviluppo di efficaci vaccini. È auspicabile che sia fatto ogni sforzo in tal senso, in considerazione della sempre crescente diffusione ed importanza socio-economica dell'AIDS in Italia e nel mondo.

Le richieste di estratti vanno indirizzate a: Prof. Mauro Bendinelli, Sezione di Virologia, Dipartimento di Biomedicina, Università di Pisa, via S. Zeno 35/39, 56127 Pisa.