



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOMEDICINA

INDIRIZZO: VIROLOGIA

CICLO: XXVI

**Studio longitudinale dell'evoluzione del tropismo per X4/R5,  
dei livelli di HIV-1 DNA cellulare, dei parametri immunologici e  
della viremia residua in una popolazione di pazienti naive trattati  
con successo**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Giorgio Palù

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Riccardo Manganelli

**Supervisore :** Ch.mo Prof. Saverio Giuseppe Parisi

**Dottoranda :** Samantha Andreis

ANNO ACCADEMICO 2012-2013







# INDICE

1. INTRODUZIONE .....	1
1.1 Struttura del virione.....	1
1.2 Organizzazione del genoma .....	2
1.3. Ciclo di replicazione.....	4
1.4 Epidemiologia dell'infezione da HIV .....	6
1.5 Variabilità genetica ed evoluzione del virus .....	8
1.5.1 Distribuzione geografica dei sottotipi di HIV-1 .....	10
1.6 Fisiopatologia e modalità di trasmissione .....	11
1.7 Patogenesi e decorso clinico di HIV .....	11
1.7.1 Infezione acuta e set point virale.....	12
1.7.2 Infezione cronica e latenza clinica .....	14
1.7.3 Fase sintomatica o sindrome da immunodeficienza conclamata.....	15
1.8 La terapia antiretrovirale .....	16
1.8.1 Inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (nrti).....	17
1.8.2 Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI).....	17
1.8.3 Inibitori delle proteasi (PI) .....	18
1.8.4 Nuove classi di farmaci .....	18
1.9 DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA HIV .....	19
1.9.2 Monitoraggio virologico dell'infezione da HIV.....	25
1.9.3 Diagnosi immunologica .....	28
1.10 Il FOLLOW-UP del paziente infetto.....	31
1.11 HIV reservoir.....	31
1.12 Monitoraggio di HIV-DNA nella pratica clinica.....	34
1.12.1 Le varie forme di HIV-DNA.....	34
1.12.2 Ruolo dell'HIV-DNA nel monitoraggio delle strategie terapeutiche.....	35
1.13 Tropicismo .....	36
1.13.1 Il gene env .....	36

1.13.2	Ruolo dei corecettori nell'infezione da HIV-1 .....	38
1.13.3	Corecettori e tropismo .....	39
1.13.6	Test fenotipici per la determinazione del tropismo .....	46
1.13.7	Test genotipici per la determinazione del tropismo.....	47
1.13.8	Tropismo e carica netta del V <sub>3</sub> loop .....	49
1.13.9	Tropismo e sottotipi non-B.....	50
2.	SCOPO DELLO STUDIO .....	51
3.	MATERIALI E METODI.....	53
3.1	Disegno dello studio .....	53
3.2	Preparazione dei campioni.....	54
3.3	Test di avidità anticorpale.....	55
3.4	Quantificazione della viremia plasmatica.....	56
3.5	Quantificazione della viremia residua .....	56
3.6	Estrazione del DNA cellulare dai linfomonociti del sangue periferico .....	57
3.7	Determinazione quantitativa del DNA totale di HIV-1 nei linfomonociti .....	57
3.8	Genotipizzazione del tropismo virale nei PBMCs.....	58
3.8.1	Sequenziamento.....	58
3.8.2	Predizione del tropismo virale mediante <i>Geno2pheno coreceptor</i> .....	60
3.9	Analisi statistiche.....	61
4.	RISULTATI .....	63
4.1	Coorte I.....	63
4.1.1	Caratteristiche dei pazienti della coorte I .....	63
4.1.2	Confronto tra il T <sub>1</sub> e il baseline (T <sub>0</sub> ) del tropismo e dei parametri viro-immunologici .....	65
4.1.3	Analisi del tropismo ai tempi di follow-up T <sub>1</sub> e T <sub>2</sub> .....	66
4.1.4	Analisi del tropismo ai tempi di follow-ups T <sub>0</sub> , T <sub>1</sub> e T <sub>2</sub> .....	68
4.1.5	Verifica di qualità del saggio genotipico .....	69
4.1.6	Regressione logistica multilivello .....	69
4.2	Coorte II.....	70
4.1.1	Caratteristiche dei pazienti della coorte II.....	70

4.2.2 Confronto longitudinale dei parametri viro-immunologici .....	70
5. DISCUSSIONE.....	77
5.1 COORTE I.....	77
5.2 COORTE II .....	79
6. CONCLUSIONI.....	83
BIBLIOGRAFIA.....	85





## ABSTRACT

**Background:** Nowadays HIV-1 RNA levels and CD4<sup>+</sup> T lymphocyte counts are the standard markers used in clinical practice for the management of HIV infection. However the evolution of HIV infection can be monitored also by measuring HIV-DNA and this measurement can be determined in PBMCs, even during powerful and prolonged antiretroviral therapy.

In successful treated HIV-1 patients, viral load is undetectable and the strategies for managing long-term side effects may involve a new class of antiretroviral-like CCR5 antagonists. Moreover the dynamics and the influence of viral tropism on the course of HIV-1 infection in subjects exposed to antiretroviral therapy are not fully understood. Then the evolution and determination of HIV-1 tropism based on cellular DNA sequence could be useful for patients with a successfully suppressed plasma viral load.

**Aims:** In this study we aimed to determine whether the HIV-1 tropism for CXCR4 or CCR5 correlates with residual viraemia, cellular HIV-1 DNA load and CD4<sup>+</sup> count; moreover, we evaluated if exist a correlation between baseline and follow-up HIV-1 DNA levels with residual viraemia, baseline plasma HIV-1 RNA, and the condition of primary or chronic HIV infection at the start of antiretroviral therapy.

**Methods:** In the CAVeAT, that is a prospective cohort of HIV-infected patients enrolled starting from 2004 in five infectious diseases units in Northeastern Italy (Veneto region), we retrospectively selected two subgroup of patients (cohort I and cohort II); they were a subset of subjects achieving virological suppression within 6 months after initiation of first-line therapy and maintaining plasma HIV RNA levels < 50 copies/ml, without virological failures, until evaluation at the follow-up time points. In order to be included in the our study, the patients needed to be naïve and treated with effective antiretroviral therapy. None of the patients were treated with CCR5 antagonists. The cohort I consisted on 219 patients with median follow-up time of 3 years (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>) while the cohort II was represented of 181 patients with median follow-up times of 4 years (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>). Genotypic analysis of viral tropism was performed on PBMCs through the sequencing of V<sub>3</sub> loop of gp120; the generated sequences were interpreted using the bioinformatic tool Geno2pheno coreceptor while proviral DNA was quantified by Real-Time PCR using TaqMan probes.

**Results:** In the cohort I, HIV-1 DNA, CD4<sup>+</sup> count and plasma viraemia were available from all 219 patients at T<sub>0</sub> and T<sub>1</sub>, and in 86 subjects at T<sub>2</sub>, while tropism determinations were available from 109 subjects at T<sub>0</sub>, 219 at T<sub>1</sub>, and from 86 subjects at T<sub>2</sub>. The results showed that achieving a residual viraemia < 2.5 cp/ml at T<sub>1</sub> correlated with having the same condition at T<sub>2</sub> and that there was a positive correlation between T<sub>0</sub> and T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> tropism. X4 tropism at T<sub>1</sub> negatively correlated with the possibility of achieving viraemia < 2.5 cp/ml at T<sub>2</sub> while a positive correlation between viremic suppression and R5 coreceptor affinity was found.

In 181 patients of the cohort II, viroimmunological data were collected at baseline (T<sub>0</sub>) and at two follow-up time points (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>); in a subgroup of 70 subjects, we evaluated also a third follow-up time point (T<sub>3</sub>). We observed that high baseline plasma HIV-1 RNA values positive correlated with high levels of HIV-1 DNA at T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> and negative correlated with residual viraemia at T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>; having high levels of HIV-1 DNA at T<sub>0</sub> positive correlated with high values at T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> and negatively correlated with achieving residual viraemia. Primary infection was associated with lower probability of having high HIV-1 DNA levels at T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> and with a higher probability of achieving residual viraemia at T<sub>1</sub> and T<sub>3</sub>, with respect to chronic infection.

**Conclusions:** The tropism of archived virus was stable during an effective treatment, although a low percentage of patients switched over time. R5 tropism and its stability were related to achieving and maintaining viraemia < 2.5 copies/ml, in treatment responder patients, suggesting a relation among viral tropism and response to treatment in the long term.

Moreover, we demonstrated a strong and long-lasting correlation between viral load and cellular HIV-1 DNA before and after the start of HAART and that cellular HIV-1 DNA is closely related to residual viraemia over long-term follow-up of ART responders, particularly when treated during primary infection.

## RIASSUNTO

**Background:** Fino ad oggi nella pratica clinica la gestione dell'infezione da HIV-1 ha utilizzato come marcatori prognostici i livelli di RNA plasmatico e il numero dei linfociti CD4<sup>+</sup>. Tuttavia nei pazienti trattati, l'evoluzione dell'infezione da HIV può essere valutata anche misurando l'HIV-1 DNA nei reservoirs.

In pazienti HIV-1 trattati con terapia di successo, la carica virale è non rilevabile e le strategie per la gestione degli effetti collaterali a lungo termine potrebbero considerare l'utilizzo di una nuova classe di antiretrovirali antagonisti del CCR5. Inoltre non è ancora stato del tutto chiarito come il tropismo virale e la sua evoluzione influenzino il decorso dell'infezione da HIV-1 in soggetti in terapia antiretrovirale. Quindi per valutare come gestire i pazienti trattati con successo nei quali la carica virale è soppressa, potrebbe essere utile determinare l'evoluzione del tropismo di HIV-1 sul DNA cellulare.

**Scopo:** In questo studio di coorte costituita da pazienti naive trattati con successo abbiamo valutato se il tropismo per CXCR4 o CCR5 di HIV-1 correla con la viremia residua; inoltre abbiamo determinato se esiste una correlazione tra i livelli di HIV-1 DNA cellulare (al baseline e ai follow-up) con la viremia residua, l'HIV-1 RNA al baseline, e con il fatto di avere un'infezione acuta all'inizio della terapia antiretrovirale.

**Materiali e metodi:** All'interno della coorte CAVeAT, che è una coorte prospettica di pazienti HIV positivi arruolati a partire dal 2004 da cinque Unità di Malattie Infettive della regione Veneto, sono stati retrospettivamente selezionati due sottogruppi di pazienti (coorte I e coorte II); sono tutti pazienti che hanno raggiunto una soppressione virologica entro i 6 mesi dopo il primo trattamento e hanno mantenuto livelli di HIV-1 RNA al di sotto di 50 copie/ml senza fallimento virologico per tutti i tempi di follow-up. Per essere eleggibili, i pazienti dovevano essere naive e poi essere trattati con una terapia antiretrovirale di successo. Nessuno dei pazienti doveva essere in trattamento con gli antagonisti del CCR5. La coorte I era costituita da 219 pazienti con una mediana di follow-up di 3 anni (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>) mentre la coorte II era rappresentata da 181 pazienti con una media di follow up di 4 anni (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>). Le analisi genotipiche per il tropismo virale sono state eseguite su PBMCs mediante sequenziamento del loop V<sub>3</sub> di gp120; le sequenze ottenute sono state interpretate utilizzando l'algoritmo bioinformatico *Geno2pheno coreceptor* mentre il DNA provirale è stato quantificato mediante Real-Time PCR utilizzando sonde TaqMan.

**Risultati:** Nella coorte I, la valutazione dell'HIV-1 DNA, della conta dei CD4<sup>+</sup> e della viremia è stata effettuata su tutti i 219 pazienti al T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>, e su 86 soggetti al T<sub>2</sub>; il tropismo è stato determinato solo in 109 soggetti al T<sub>0</sub>, su tutti i 219 al T<sub>1</sub>, e in 86 pazienti al T<sub>2</sub>. I risultati hanno mostrato che il raggiungere una viremia residua al di sotto di 2.5 cp/ml al T<sub>1</sub> correlava con il suo mantenimento al T<sub>2</sub> e che c'era una correlazione positiva tra il tropismo al T<sub>0</sub> e quello ai follow-up ( T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> ). Avere un tropismo X4 al T<sub>1</sub>

correla negativamente con la possibilità di raggiungere una viremia residua al di sotto di 2.5 cp/ml al T<sub>2</sub> mentre è stata trovata una correlazione positiva tra soppressione virologica e tropismo R5.

Nei 181 pazienti della coorte II, i dati viro-immunologici sono stati eseguiti per tutti i soggetti al baseline (T<sub>0</sub>) e ai due tempi di follow-up (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>); in un sottogruppo di 70 pazienti, abbiamo preso in considerazione anche un terzo tempo di follow-up (T<sub>3</sub>). Quindi abbiamo osservato che alti livelli di HIV-1 RNA al baseline correlavano positivamente con alti livelli di HIV-1 DNA al T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> e negativamente con la viremia residua al T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>; avere alti livelli di HIV-1 DNA al T<sub>0</sub> correlava positivamente con alti livelli anche al T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> e negativamente con il raggiungimento della viremia residua al di sotto delle 2.5 copie/ml. Avere un'infezione acuta, piuttosto che cronica, all'inizio della terapia era associato con una più bassa probabilità di avere alti livelli di HIV-1 DNA al T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> e con una più alta probabilità di raggiungere una viremia residua al T<sub>1</sub> e T<sub>3</sub>.

**Conclusioni:** Il tropismo del virus archiviato è rimasto stabile durante tutto il periodo della terapia, sebbene in una bassa percentuale di pazienti sia cambiato nel tempo. In pazienti trattati con una terapia di successo, il tropismo R5 e la sua stabilità sono stati confrontati con il fatto di raggiungere e mantenere una viremia residua al di sotto di 2.5 copie/ml, suggerendo una relazione tra il tropismo virale e la risposta ad una terapia a lungo termine. Inoltre, è stata dimostrata una forte correlazione tra la carica virale e l'HIV-1 DNA prima e dopo l'inizio della terapia antiretrovirale (ART) e che l'HIV-1 DNA cellulare è strettamente connesso alla viremia residua nel follow-up a lungo termine nei soggetti rispondenti alla terapia, in modo particolare se trattati durante l'infezione acuta, ovvero il prima possibile.

# 1. INTRODUZIONE

Il virus dell'immunodeficienza acquisita di tipo 1 (HIV-1) è stato identificato come agente eziologico dell'AIDS nel 1983 (Gallo et al, 2003).

L'HIV è classificato nella famiglia *Retroviridae*, che comprende virus a genoma diploide costituito da RNA a singolo filamento a polarità positiva, dotati di involucro pericapsidico (Murray et al, 2007). I retrovirus codificano una DNA polimerasi RNA-dipendente, denominata trascrittasi inversa o retrotrascrittasi (RT), mediante la quale, a partire dal proprio RNA genomico, sintetizzano un trascritto intermedio di DNA bicatenario (dsDNA). Il DNA sintetizzato può integrarsi nel genoma dell'ospite, divenendo così un gene cellulare, o permanere nel nucleo come DNA lineare o circolare episomiale. Il virus integrato è definito provirus, e al fine di riprodursi viene a sua volta trascritto in RNA dalla RNA polimerasi II cellulare (D'Ettore et al, 2010).

I Retrovirus sono stati isolati nella maggior parte dei vertebrati e associati a molti tipi di patologie che spaziano da forme tumorali, alterazioni del sistema immunitario e forme neurologiche di tipo degenerativo.

Recentemente la classificazione dei generi di questa famiglia è stata modificata dalla “*International Committee on Taxonomy of Viruses*”. Gli alfaretrovirus, i betaretrovirus e i gammaretrovirus sono considerati “simple”, mentre i deltaretrovirus, gli epsilonretrovirus, i lentivirus e gli spumaretrovirus sono considerati “complex”; quest'ultimi a differenza dei “simple”, oltre a codificare i prodotti dei geni *gag*, *pol* ed *env*, codificano un “*pathway*” di piccole proteine regolatorie.

Il genere *Lentivirus* comprende virus in grado di causare disordini di tipo degenerativo a carico del sistema immunitario e nervoso, caratterizzati da una progressione molto lenta, virus in grado di causare patologie nell'animale, per esempio FIV (virus dell'immunodeficienza del gatto) o SIV (virus della immunodeficienza della scimmia), e nell'uomo (HIV-1 e 2: virus dell'Immunodeficienza umana di tipo 1 e 2) (Coffin et al, 1997). Patogeni per l'uomo oltre ai virus dell'Immunodeficienza umana di tipo 1 e 2, sono i virus associati alla leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto (Human T-cell Leukemia/lymphoma Virus – HTLV) di tipo 1, 2, 3 e 4 (HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3, HTLV-4) (Mahieux et al, 2009).

## 1.1 Struttura del virione

Il virione di HIV ha una struttura sferica del diametro di circa 100-120 nm, con due membrane: un capsidico di forma conoide e un envelope, che ospita la glicoproteina di attacco (gp120) e la proteina di fusione (gp41) derivanti entrambe dal taglio proteolitico di gp160, codificata da *env* (Fig 1.1). Associato alla superficie esterna dell'envelope si trova il tegumento virale, ovvero uno strato di materiale elettrondenso costituito completamente dalla proteina virale miristilata, detta *matrix antigen* (MA o p17). La miristilazione è un fenomeno importante per la successiva interazione della p17 con la membrana

cellulare al fine di dare avvio alla liberazione di nuovi virus replicati dentro la cellula, con un processo di gemmazione. Il contenuto del core è rappresentato da due molecole di RNA genomico associate alle proteine nucleo-capsidiche (NC o p9), dalle trascrittasi inverse (RT), dall'integrasi (IN) e da due molecole di tRNA. MA, CA, NC derivano dal taglio proteolitico di p55, a sua volta prodotto di trascrizione di *gag-pol*. Infine, MA, CA, gp120, gp41 e i loro precursori gp55 e gp160 sono le proteine più rilevanti dal punto di vista antigenico. Tuttavia l'efficacia degli anticorpi neutralizzanti anti-gp120 è assai compromessa in vivo dall'estrema variabilità del virus a livello di *env*, cosicché il virus è spesso in grado di sfuggire agli anticorpi anti-gp120 preesistenti (Moroni et al, 2008).

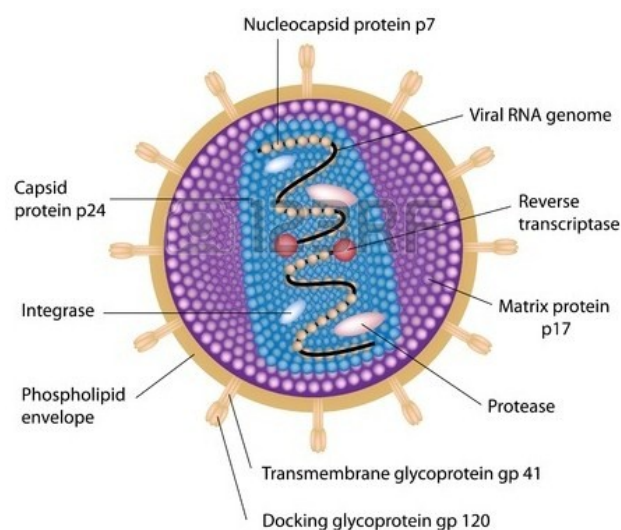


Figura 1.1 Modello della struttura dell'HIV-1 (Coffin et al, 1997).

## 1.2 Organizzazione del genoma

Il genoma di HIV è costituito da due filamenti di RNA positivo monocatenario (ssRNA) della lunghezza di 9,8 kb, poliadenilati all'estremo 3' e legati assieme agli estremi 5', probabilmente per il formarsi di legami a idrogeno tra sequenze complementari. In prossimità dell'estremo 5' la singola molecola genomica è appaiata a una piccola molecola di RNA transfer (tRNA) di origine cellulare, con funzione di innesco per la trascrittasi inversa (Murray et al, 2007).

L'HIV è un retrovirus dal genoma complesso definito tale per la presenza, oltre ai geni principali (*gag*, *pol*, *env*) dei retrovirus semplici, di geni che codificano numerose proteine regolatorie che richiedono un processo trascrizionale più complesso (*splicing*) rispetto a quello dei tre geni principali (Murray et al, 2007).

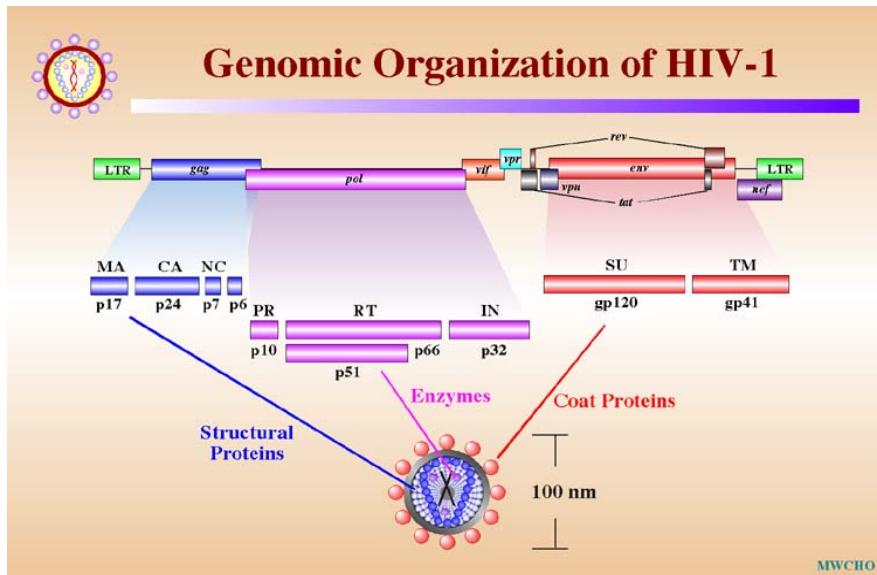


Figura 1.2 Genoma di HIV

Sia *gag* che *pol* sono trascritti in un mRNA che viene poi tradotto in una proteina di 180 kDa (p180) che viene poi clivata tramite proteolisi. La sua scissione determina la formazione della proteasi (p10), della trascrittasi inversa (p51/p66), dell'integrasi e di una proteina di 55 kDa (p55). Dalla p55, sempre per proteolisi, derivano la p17, la p24 e la p15. La p15 è il progenitore della p9 e della p7, anch'esse ottenute tramite l'intervento della proteasi.

Il gene *env* viene tradotto in una proteina di 88 kDa che viene successivamente glicosilata e a seguito di ciò il suo peso molecolare aumenta fino a 160 kDa (p160). Essa viene scissa, attraverso la proteasi virale, a formare le due glicoproteine legate alla membrana esterna: la gp120 e la gp41. La gp41 è una proteina transmembrana con l'estremo NH<sub>2</sub> localizzato all'interno del virione mentre la parte COOH è esterna e serve come punto di legame per la gp120.

Oltre a questi geni, HIV contiene altri sette geni accessori che hanno funzioni regolatorie e accessorie del ciclo virale e della sintesi proteica: *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *tev*, *vif*, *vpu* (quest'ultimo nel genoma di HIV-2 non esiste e ve n'è un altro chiamato Vpx). Agli estremi si trovano due sequenze (dette *long terminal repeats*, LTR) contenenti elementi regolatori dell'espressione genica. In esse infatti si trovano regioni di legame per fattori sia di origine virale che cellulare, i quali possono così aumentare o inibire il livello di trascrizione del genoma; nelle sequenze LTR si ritrovano siti di poliadenilazione per il legame di fattori di trascrizione come SP1 e NF-κβ, la sequenza regolatrice TATA, la sequenza di trans attivazione (dove si va a legare la proteina Tat), e anche zone con elementi regolatori inibenti.

Il gene *tat*, composto di due esoni, codifica per una proteina di 14.15 kDa con funzione di trans attivatore che, in collaborazione con un fattore cellulare, è in grado di intensificare l'espressione dei geni virali. La sua azione si esplica tramite il legame a una regione degli LTR definita TAR (*trans active region*); si ritiene che con la sua azione sia in grado di aumentare la trascrizione dei geni virali di circa 1000 volte.

Il gene *rev* è essenziale per la trascrizione dei geni *gag*, *pol* ed *env*; infatti, sembra che agisca su *env* a livello post- trascrizionale legandosi a una metà del gene sbloccando così la traduzione precedentemente

inibita dal legame di fattori cellulari; probabilmente l'azione a livello di *pol* e *gag* è simile. Inoltre, sembra che sia in grado di inibire lo splicing del gene *env*.

Il gene *nef* codifica per una proteina di 27 kDa capace di legare il GTP, dotata di attività GTP-asi, suscettibile di miristilazione e fosforilazione. Essa esplica un'azione inibitrice della trascrizione legandosi alla regione RN degli LTR.

Il gene *vpr* codifica per una proteina di 15 kDa (p15) che si ritrova associata al virione. Si sospetta che essa sia coinvolta nella riattivazione del virus in corso di infezione latente. Altri dati, inoltre, fanno supporre una sua possibile partecipazione nell'infezione di cellule a bassa proliferazione (come i macrofagi) e nel blocco del ciclo cellulare nella fase G2 al fine di favorire l'attività degli LTR.

Per quanto riguarda i geni rimanenti sembra che: *vif* sia importante per l'infettività del virione e, inoltre, che interagisca con una citidina deaminasi cellulare prevenendone la sua inclusione all'interno del virione in formazione ed evitando che essa possa danneggiarne il materiale genetico; che *vpu* intervenga nella maturazione e liberazione del virus e che abbia anche la funzione di degradare la proteina CD4 all'interno del reticolo endoplasmatico. La funzione del gene *tev* è ancora ignota.

Il genoma di HIV è ricco di zone di sovrapposizione; ciò avviene non solo tra geni codificanti ma anche tra questi ultimi e varie regioni regolatorie. Quest'alta presenza di embricature nel genoma fa sì che ogni proteina possa venir sintetizzata solamente a seguito di complessi fenomeni di splicing alternativo (Freed, 2001; Murray et al, 2007).

### **1.3. Ciclo di replicazione**

Il primo passo del ciclo replicativo consiste nell'interazione tra le proteine dell'envelope virale e i recettori di superficie della cellula ospite, in particolare il ligando virale gp120 lega ad alta affinità il recettore CD4 presente sui linfociti T; HIV è in grado di infettare anche altre cellule che possiedono, seppure in quantità minore, il recettore CD4: macrofagi, cellule della microglia del sistema nervoso centrale e cellule dendritiche dei linfonodi, le cellule cromaffini delle pareti intestinali, l'endotelio dei vasi sanguigni, i precursori delle cellule del sangue e i linfociti B e T CD8+ (Moroni et al, 2008). Nel riconoscimento della cellula bersaglio risultano coinvolte alcune regioni conservate della gp120 (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>); il contatto fra la gp120 e la superficie cellulare espone una regione interna della molecola, l'ansa variabile V<sub>3</sub>, che dimostra affinità per le proteine appartenenti alla famiglia dei recettori per le chemochine  $\alpha$  e  $\beta$ , (proteine a sette domini transmembrana associate a proteine G), che normalmente trasmettono segnali in risposta a chemochine. Molti dei membri di questa famiglia possono legare la gp120, ma l'infezione è più spesso correlata alla presenza del recettore per le  $\alpha$ -chemochine CXCR4 e del recettore per le  $\beta$ -chemochine CCR5. Il fatto che i due recettori possano essere presenti in momenti diversi e su cellule diverse, CXCR4 sui linfociti e CCR5 sui macrofagi, spiega la possibilità di isolare ceppi virali con diverso tropismo (Moroni et al, 2008). Da notare come esista una piccola percentuale di individui quasi completamente resistente all'infezione da HIV proprio in quanto l'espressione dei corecettori è deficitaria (es:  $\Delta 32$  di CCR5) (De Angelis et al, 2007).



Dopo che è avvenuto il legame si avviano i fenomeni che danno luogo alla fusione tra la membrana virale e quella della cellula, che ha come protagonista la proteina gp41. Il processo di fusione è innescato da cambiamenti conformazionali scatenati dal legame con CD4 e, probabilmente, anche dall'attacco dell'ansa V3 di gp120 da parte di alcune proteasi cellulari. La proteina gp41 ha una parte N-terminale, formata da aminoacidi apolari, che si inserisce nella membrana cellulare. All'interno della cellula ospite il nucleocapside virale verrà degradato dagli enzimi cellulari liberando quindi l'RNA virale nel citoplasma della cellula bersaglio, dove la retrotrascrittasi convertirà l'acido nucleico genomico in DNA a doppio filamento. Al termine della retrotrascrizione quindi, il genoma virale è costituito da una duplice catena di DNA lineare associata all'integrasi, a Vpr e a p17 formando il cosiddetto "complesso di preintegrazione" (PIC) che migra nel nucleo. Nelle cellule infettate, il DNA si può trovare in diverse forme: lineare integrato, lineare e come forma circolare non integrata.

L'integrasi dirige il processo di integrazione con estrema efficienza. L'enzima inizialmente opera il distacco di due nucleotidi da ognuna delle estremità del DNA virale; successivamente scinde il DNA cellulare e infine catalizza la reazione di legame inserendo il DNA virale in quello cellulare. Infine, probabilmente grazie ad enzimi cellulari, si ha la riparazione delle giunzioni tra DNA virale integrato e DNA genomico dell'ospite con formazione del provirus integrato. Le forme integrate possono essere trascrizionalmente attive (produttive) o passare allo stato di latenza e costituire il *reservoir* virale (D'Ettore et al, 2010) (Fig. 1.3).

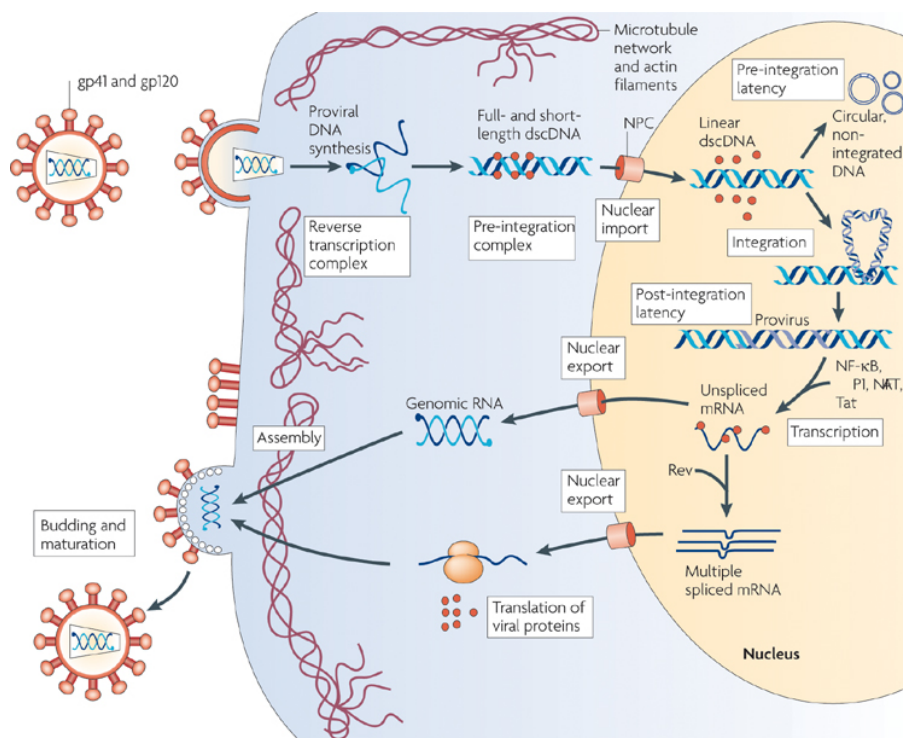


Figura 1.3 Ciclo replicativo del virus HIV.

Il provirus integrato viene trascritto dalle RNA polimerasi II cellulari, e il trascritto è quindi processato e tradotto nelle diverse proteine del virus. Non è chiaro quale sia l'input che dà l'avvio alla trascrizione del genoma virale, ma sicuramente è legato a tutte le occasioni di stimolazione del sistema immunitario ed è probabilmente indotto da un insieme di stimoli: antigeni, citochine o anche infezioni da parte di altri virus. Esperimenti hanno infatti dimostrato che quando i linfociti e i macrofagi infetti si attivano per la loro normale riproduzione, anche la trascrizione virale tende ad attivarsi; Tra i fattori più coinvolti in questo processo sembrano esserci NF- $\kappa$ B e citochine quali IL-6 e TNF- $\alpha$  (Murray et al, 2007). Un secondo livello di regolazione dell'espressione provirale è a livello delle proteine *tat* e *rev*, la cui sintesi iniziale favorisce l'espressione degli altri geni provirali.

Come precedentemente accennato non tutto il DNA si integra nel genoma della cellula ospite. Le altre forme di HIV DNA possono essere considerate come prodotti secondari e sono rappresentate dalle forme lineari e circolari non integrate, che vengono distinte in 1-LTR o 2-LTR in base alla presenza di una o due sequenze long terminal repeat (LTR).

L'espressione dei geni virali è divisa in due fasi: precoce e tardiva. Nella prima vengono espressi i geni regolatori mentre nella seconda quelli strutturali. I geni regolatori, di cui i più noti sono *tat*, *nef* e *rev* e la cui sintesi avviene nel citoplasma grazie a eventi di splicing molteplici, consentono l'amplificazione della trascrizione genica a opera della RNA polimerasi cellulare di tipo II e la stabilizzazione degli RNA messaggeri creati successivamente. Nella fase tardiva avviene la sintesi dei geni strutturali i cui trascritti vengono portati nel citoplasma e li sottoposti a un solo splicing e infine tradotti in proteine. È a questo livello che interviene la proteina *rev* che, come espresso precedentemente, si lega ai trascritti e ne facilita il trasporto nel citoplasma. Sono quindi prodotti gli enzimi virali e le proteine strutturali, codificati da *gag-pol*. Le glicoproteine codificate da *env* sono glicosilate e processate a livello del reticolo endoplasmatico e apparato di Golgi, ed in seguito sono indirizzate verso la membrana plasmatica. Infine, due copie di RNA genomico, derivanti dalla trascrizione del provirus, si legano alle proteine del capsido e del tegumento. Il nucleocapside, circondato da una porzione di membrana plasmatica cellulare e glicoproteine virali che costituirà l'envelope, gemma dalla membrana plasmatica e viene liberato nello spazio extracellulare. I virioni sintetizzati sono liberi di iniziare un nuovo ciclo di replicazione. Non tutti i virioni, ad ogni modo, sono infettivi: nei retrovirus lo sono circa l'1% delle particelle virali sintetizzate.

## **1.4 Epidemiologia dell'infezione da HIV**

Con l'introduzione, nel 1996, delle nuove terapie antiretrovirali (ART) è aumentata la sopravvivenza delle persone infettate da HIV ed è diminuito il numero dei decessi correlati all'AIDS, trasformando così l'infezione da HIV in un'infezione cronica. Secondo le stime WHO e UNAIDS del 2012, il numero delle persone infette da HIV nel mondo ha raggiunto 35.3 milioni (tra 32.2 e 38.8 milioni, più precisamente), di cui 3.3 milioni sono minori sotto i 15 anni, e 17.7 milioni le donne.

Nel solo 2012 sono stati infettati 2.3 milioni di persone, di cui 260000 bambini sotto i 15 anni; sempre nel solo 2012 sono morti per decessi AIDS-correlati 1.6 milioni di infetti, di cui 210000 sotto i 15 anni di età

(WHO HIV/AIDS, 2012). Secondo il rapporto globale, delle 6300 nuove infezioni al giorno nel 2012, il 95% sono avvenute in paesi a basso e medio reddito e circa 700 hanno colpito bambini sotto i 15 anni. Sempre secondo stime WHO del 2012, gran parte di quei 35.3 milioni di infetti, viveva nell’Africa sub-Sahariana (25 milioni), tanto che in quella regione la prevalenza dell’infezione nella popolazione adulta era del 4.7%.

In Europa Occidentale e Centrale, il numero degli infetti era 860000, mentre la prevalenza negli adulti era dello 0.2%. In questa regione, comprendente l’Italia, nel 2012 si sono infettate 29000 persone e sono morti per AIDS 7600 infetti, tra adulti e bambini. In Italia, sempre nel 2012, sono state infettate circa 94146 persone e la prevalenza negli adulti è stata dello 0.16%. Le morti da AIDS nel 2012 sono state inferiori a 1000 (UNAIDS, 2012) (Fig. 1.4)

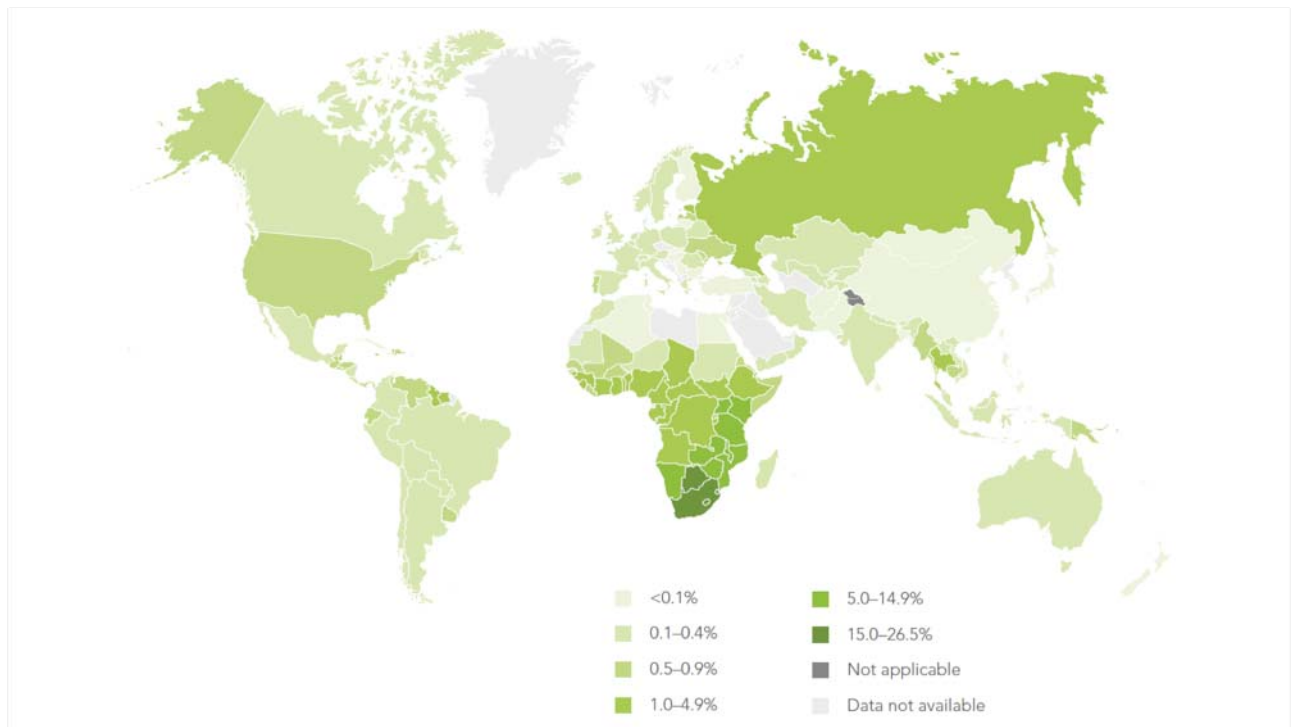


Figura 1.4 Prevalenza globale dell’infezione da HIV negli adulti nel 2012 (WHO HIV/AIDS, 2012).

Delle 94146 persone viventi con HIV in Italia, il 70.1% sono maschi e l’84.3% sono di cittadinanza italiana.

Il 3.2% ha meno di 24 anni, il 63.5% ha un’età compresa tra i 25 e i 49 anni, il 25.1% ha un’età compresa tra i 50 e i 59 anni e l’8.2% ha più di 60 anni (Raimondo et al, 2013).

La modalità di trasmissione più frequente è quella eterosessuale (37.2%), mentre i consumatori di sostanze per via iniettiva (IDU) sono il 28.5% e gli omosessuali (MSM, men who have sex with men) rappresentano il 27.7%. Il 15.5% delle persone in carico ha un numero di CD4 inferiore a 350 cell/ml e, di questi, il 47.8% ha un numero di CD4 inferiore a 200 cell/ml, mentre il 41.4% è allo stadio clinico A e il 25.9% in AIDS.

La nostra indagine nazionale ha rilevato 94146 persone che vivono con l'HIV o con l'AIDS in Italia. Ovviamente questa stima non include la quota delle persone inconsapevoli dell'infezione, cioè HIV positive ma che non sono ancora state diagnosticate e che non conoscono il loro sierostato. Per calcolare la quota delle persone inconsapevoli dell'infezione da HIV e non ancora diagnosticate possono essere usati vari metodi, ognuno dei quali porta a stimare una diversa proporzione. Pertanto, la stima delle persone inconsapevoli dell'infezione da HIV può variare dal 13% al 40% (Hamers et al, 2008), modificando notevolmente il numero finale delle persone viventi con l'infezione da HIV e con l'AIDS. Considerando queste stime, infatti, il numero delle persone viventi con l'HIV e con l'AIDS in Italia potrebbe variare da 108214 a 156910. Di conseguenza, nel 2012 la stima della prevalenza delle persone viventi infette con l'HIV (considerando la quota di persone inconsapevoli dell'infezione) potrebbe oscillare dallo 0.18 allo 0.26 per 100 residenti (Fig. 1.5). Bisogna infine rimarcare che la diffusione dell'HIV-2 è estremamente bassa e limitata ad alcune nazioni dell'Africa Occidentale (in particolare, Guinea Bissau, dove la prevalenza dell'infezione raggiunge il 7% nella popolazione urbana) (Moroni et al, 2008), ed è quindi per il maggior interesse epidemiologico che questa tesi, come la maggior parte degli studi attuali, si concentra sull'HIV-1.

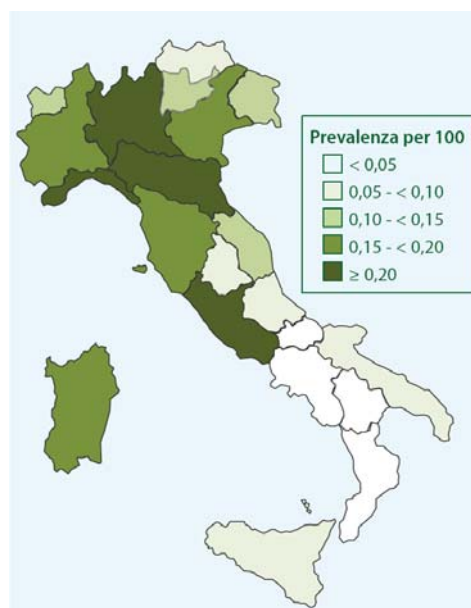


Figura. 1.5 Prevalenza delle persone viventi con l'HIV e con l'AIDS (per 100 residenti)

## 1.5 Variabilità genetica ed evoluzione del virus

HIV-1 è caratterizzato da un'ampia eterogeneità genetica da ricondursi a parecchi fattori, come la mancanza dell'attività di *proofreading* della trascrittasi inversa (RT), il rapido turnover di HIV-1 *in vivo*, la pressione immunologica selettiva dell'ospite, ed eventi di ricombinazione durante la replicazione (Buonaguro et al, 2007). Inevitabilmente questa caratteristica condiziona la *clearance* immunitaria del virus, la virulenza e il tropismo dello stipite, oltre alle manifestazioni cliniche, la storia clinica della malattia e la resistenza ai farmaci antivirali. Non di meno, è alla base dell'estrema difficoltà che si

riscontra oggi nei tentativi di produzione di un vaccino profilattico, tanto più che la maggior variabilità si rileva proprio a livello delle glicoproteine dell'envelope, la cui funzione le rende i bersagli più appetibili per un eventuale vaccino.

E' ritenuto comunemente che il virus si sia evoluto solo recentemente come patogeno umano, ovvero nei primi decenni del XX secolo, a partire dall'omologo virus dei primati (SIV) (Moroni et al, 2008). Da studi filogenetici è possibile classificare gli stipti di HIV-1 in tre gruppi principali: gruppo M (main), gruppo O (outlier), e gruppo N (non-M/non-O) (Ayoub et al, 2000).

Alcune mutazioni hanno dato origine a sottotipi stabilizzati di HIV, a loro volta frammentati in sotto-sottotipi, chiamati clade. Il gruppo M è stato suddiviso in undici sottotipi che sembra siano stati originati da un singolo evento originario di trasmissione scimpanzé-uomo, mentre gli stipti dei gruppi O ed N paiono derivare da eventi indipendenti. All'interno del gruppo M, la variabilità genetica media tra sottotipi è del 15% per il gene *gag* e 25% per il gene *env* (Buonaguro et al, 2007). Il gruppo O viene suddiviso da alcuni ricercatori in cinque sottotipi (I-V); il gruppo N è fisiologicamente più vicino al virus SIV che non ai gruppi M o O di HIV-1.

Ad ogni modo gli eventi di trasmissione paiono tutti derivati da pratiche di caccia e macellazione di primati infetti nell'Africa Sub-Sahariana. Oltre ai sottotipi di HIV-1 identificati ad oggi, sono da considerare anche le forme circolanti ricombinanti (*CRFs- Circulating Recombinant Forms*), esiti di scambi genetici tra virus appartenenti a clade diversi contemporaneamente presenti nello stesso individuo, ovvero eventi di superinfezione da parte di stipti virali distinti, tra le quali spiccano per prevalenza CRF\_01AE e CRF\_02AG (Moroni et al, 2008).

La classificazione dei sottotipi di HIV-1 è stata originariamente basata su regioni subgenomiche di geni individuali. Comunque, con un aumento del numero di isolati virali presenti nel mondo e miglioramenti nei metodi di sequenziamento, classificazioni filogenetiche di HIV-1 si basano attualmente sia sulle sequenze nucleotidiche derivate da regioni multiple subgenomiche (*gag*, *pol*, ed *env*) degli stessi isolati o sull'analisi dell'intera sequenza genomica. Infatti un "nuovo" sottotipo, per essere definito tale necessita di essere valutato sulla base della sua intera sequenza e di essere identificato almeno in tre soggetti non correlati epidemiologicamente tra di loro.

Il clade E, per esempio, precedentemente identificato sulla base del gene *env* come sottotipo a sé stante, sulla base dell'intero genoma è risultato essere un ricombinante (CRF-01) i cui geni *gag* ed *env* appartengono rispettivamente ai sottotipi A ed E; inoltre i clade B e D sono più strettamente correlati tra loro più di altri sottotipi, e il clade D è stato considerato la variante africana del clade B (Buonaguro et al, 2007). Anche il sottotipo I, inizialmente identificato sulla base di un numero limitato di sequenze del gene *env*, è risultato essere un ricombinante di tre sottotipi (A, G e I, CRF04\_cpx) sulla base dell'intero genoma.

A oggi sono stati riportati più di 34 CRF: mentre alcune sono forme dovute alla ricombinazione di 2 sottotipi, altre identificate recentemente, sono il risultato della ricombinazione di 3 sottotipi o di sottotipi con CRF. Mentre l'evoluzione dei sottotipi è governata dall'alta frequenza di errore dell'RT e

dall'elevatissima velocità di replicazione di HIV-1, le CRF sono dovute all'elevata attività di ricombinazione “*strand switching activity*” dell'RT (Buonaguro et al, 2007). Una “nuova” CRF per essere tale deve essere identificata almeno in tre soggetti non correlati tra di loro e valutata sulla base dell'intera sequenza.

Il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 2 (HIV-2) è simile all'HIV-1 relativamente alla sua morfologia strutturale, all'organizzazione genomica, al tropismo cellulare, alla citopatogenicità *in vitro*, alle vie di trasmissione della malattia e alla capacità di causare l'AIDS (Clavel et al, 1986). Tuttavia l'HIV-2 è meno patogeno dell'HIV-1 e le infezioni da HIV-2 presentano un periodo di latenza maggiore con una progressione più lenta della malattia, titoli virali più bassi e tassi più bassi di trasmissione verticale e orizzontale. L'HIV-2 è endemico nell'Africa occidentale ma le infezioni da HIV-2, anche se meno frequenti dell'HIV-1, sono state identificate negli Stati Uniti, in Europa, in Asia e in altre regioni dell'Africa. L'HIV-2 è classificato in sottotipi genetici da A a G, le cui infezioni sono quasi sempre causate dai sottotipi A e B (Yamaguchi et al, 2000).

### **1.5.1 Distribuzione geografica dei sottotipi di HIV-1**

La facilità dei trasferimenti e flussi migratori favoriscono la diffusione dei vari clade e delle forme di virus ricombinanti nel mondo intero. Studi epidemiologici molecolari mostrano che, con l'eccezione dell'Africa sub-sahariana dove sono stati rilevati quasi tutti i sottotipi, c'è uno specifico pattern di distribuzione geografica dei sottotipi e delle forme ricombinanti circolanti di HIV-1 (Gao et al, 2001). Le forme genetiche di HIV-1 prevalenti su scala globale sono i sottotipi A e C, seguiti dal sottotipo B e dai ricombinanti CRF02\_AG e CRF01\_AE. I virus sottotipo A (suddiviso in A1 e A2) sono predominanti nelle aree dell'Africa centrale ed orientale (Kenya, Uganda, Tanzania, e Rwanda) e nei paesi dell'Europa orientale che precedentemente costituivano l'Unione Sovietica. Il sottotipo B è la forma genetica principale nell'Europa occidentale e centrale, in America, e in Australia ed è anche comune in parecchi paesi del Sud-est asiatico, in Africa centro settentrionale e tra gli omosessuali in Sud africa e in Russia. I virus sottotipo C sono predominanti in quei paesi con l'80% di tutte le infezioni mondiali di HIV-1, come il Sud Africa, l'India, il Nepal e la Cina. Il sottotipo D è limitato a casi sporadici nell'Africa centro-orientale.

La rilevanza di CRF nella pandemia globale di HIV-1 è stata riconosciuta in aumento, annoverando il 18% delle infezioni (Hemelaar et al, 2006) e rappresenta la forma predominante locale nel Sud-est Asiatico (CRF02-AE) (Motomura et al, 2000) e nell'Africa occidentale e centro-occidentale (CRF02-AG) (Montavon et al, 2000). In Italia la prevalenza dei sottotipi non-B si aggira intorno al 6% con prevalenza di CRF02\_AG ma è in costante crescita (Buonaguro et al, 2008).

## 1.6 Fisiopatologia e modalità di trasmissione

La patogenesi dell'infezione è condizionata prevalentemente dalla deplezione dei linfociti T-helper CD4<sup>+</sup>. Si ricordi come i linfociti T-helper siano essenziali, mediante la secrezione di numerose citochine regolatorie (IFN $\gamma$ , IL2, IL4, IL5, IL10, GM-CSF, etc.), al controllo e alla differenziazione delle cellule linfoidee e non, e al contenimento dei diversi tipi di patogeni e neoplasie.

Nella gran parte degli infetti (circa 90%), in un periodo compreso tra sette e dieci anni, si verifica l'esordio clinico di quella che viene definita sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), che invariabilmente e rapidamente porta il paziente non curato alla morte. Si noti che una piccola percentuale degli infetti, compresa tra il 5 e il 7%, sopravvivono ad oggi senza manifestazioni cliniche e con una normale conta di cellule T CD4<sup>+</sup> nel sangue periferico. Questi pazienti sono definiti “*non-progressors*” e la ragione di questo fenomeno è ancora ignota.

Il virus si trasmette attraverso tracce di sangue e liquidi biologici, ovvero in seguito a rapporti eterosessuali ed omosessuali avvenuti senza protezioni meccaniche, all'uso promiscuo di siringhe da parte di tossicodipendenti, punture d'ago, ferite aperte a contatto con mucose infette, aghi per tatuaggi, alla trasmissione verticale madre-feto per via transplacentare o perinatale o durante l'allattamento. Infine, per via iatrogena, intesa come trasfusioni di sangue ed emoderivati, anche se al giorno d'oggi il rischio è minimizzato dagli screening delle banche del sangue. Si noti come i rapporti sessuali per via anale sia quelli più a rischio per l'inevitabile trauma delle mucose (rischio di trasmissione del 15% dei rapporti omosessuali rispetto a meno dell' 1% dei rapporti eterosessuali) (Moroni et al, 2008). Attraverso le mucose il virus infetta le cellule di Langerhans, venendo da queste trasportato a livello dei linfonodi circa due giorni dopo l'infezione. Nei linfonodi il virus diffonde ai linfociti CD4<sup>+</sup>, mentre i macrofagi probabilmente costituiscono il principale vettore del virus nell'organismo (Murray et al, 2007).

Il virus riduce elettivamente il numero dei T helper probabilmente perché questi esprimono più CD4 degli altri tipi cellulari; ne causano la morte mediante una vasta serie di meccanismi: effetto citotossico T-mediato, accumulo di copie di DNA genomico circolare episomiale, aumento di permeabilità della membrana plasmatica, formazione di sincizi e induzione dell'apoptosi (Murray et al, 2007).

L'organismo controlla l'infezione mediante i linfociti T CD8<sup>+</sup>, la cui azione citotossica elimina le cellule infette, al prezzo di ridurre il proprio numero e la propria funzione, giacché questi dipendono dai linfociti T CD4<sup>+</sup>. Ne consegue che al calo dei T CD4<sup>+</sup> corrisponde un calo dei T CD8<sup>+</sup>, di modo che la storia della malattia dipende dal numero di cellule T CD4<sup>+</sup> e dalla carica virale nel sangue o “viremia”.

## 1.7 Patogenesi e decorso clinico di HIV

Il decorso clinico dell'infezione da HIV può essere suddiviso in tre principali fasi fondamentali: l'infezione acuta che può essere sintomatica o asintomatica, una fase di latenza clinica o cronica, e la fase clinica conclamata o AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*); tuttavia tale fasi possono evolvere in modo variabile, dato che il decorso dell'infezione può essere influenzato da svariati fattori, primo tra tutti l'impiego della terapia antiretrovirale.

Nella maggioranza dei casi di pazienti senza presidi terapeutici tutto il processo si svolge nell'arco di 7-10 anni, traducendosi in un quadro patologico drammatico e che conduce alla morte del soggetto. A questo schema fanno eccezione i "long-term non progressor", che non mostrano sintomi per molti anni e che non hanno una perdita significativa di cellule CD4<sup>+</sup> (Fig 1.6).

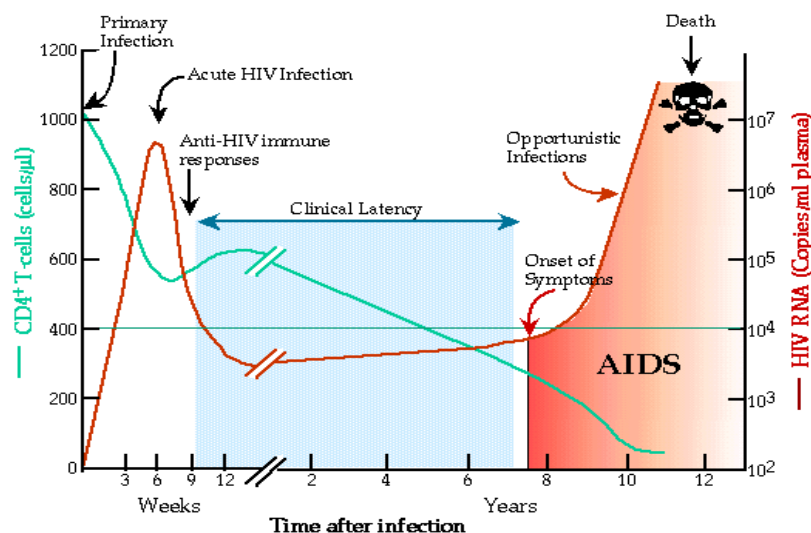


Figura 1.6 Andamento della carica virale e dei linfociti CD4<sup>+</sup> nel corso dell'infezione da HIV.

### 1.7.1 Infezione acuta e set point virale

L'infezione acuta da HIV (*Primary HIV infection*, PHI) è definita come il periodo di tempo che intercorre tra il momento dell'infezione dell'ospite e l'esaurimento della sintomatologia clinica, quando presente, o la completa sierconversione.

La durata della PHI è circa 2 settimane anche se alcuni sintomi possono persistere per 1-2 mesi; presenta caratteristiche simili ad altre infezioni virali con un periodo d'incubazione piuttosto lungo, una sintomatologia indifferenziata e una fase viremica prolungata che declina rapidamente con lo sviluppo della risposta immunitaria specifica. Da un punto di vista virologico, l'infezione acuta è caratterizzata da una spiccata replicazione virale (si rilevano infatti quasi sempre più di 10<sup>6</sup> copie di HIV-RNA/mL) che è responsabile della disseminazione del virus a livello degli organi linfoidi e nei diversi *reservoir* (soprattutto nei linfonodi, ma anche in milza, tonsille e tessuto linfoide, che sono i tessuti più ricchi in linfociti CD4<sup>+</sup>) (Little et al, 1999). In seguito alla replicazione nella sede di primo impianto i virioni vengono drenati ai linfonodi loco-regionali, dove le cellule interagiscono con i linfociti T che vengono quindi infettati. Qui il virus può essere trasmesso alle cellule dendritiche follicolari e ai linfociti T CD4<sup>+</sup>. Solo a questo punto intervengono i meccanismi immunitari che si attivano alcune settimane dopo l'infezione (2-4 settimane), perciò tale intervallo è detto "periodo finestra", mentre la comparsa degli anticorpi è detta "sierconversione"; in questa fase si riscontra una transitoria linfopenia con deplezione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> associata ad alti livelli di viremia; durante questo periodo HIV può essere facilmente isolato dal sangue e vi sono alti livelli sierici dell'antigene p24.



In assenza di terapia, la viremia plasmatica raggiunge un picco dopo un periodo post esposizione che va da 3 a 4 settimane, per poi diminuire spontaneamente per parecchi mesi prima di raggiungere un punto di equilibrio stabile o set point virale (Fiebig, 2003) (Figura 1.6). Tale equilibrio può rimanere stabile per alcuni anni ed è un indice della velocità di progressione della malattia negli individui che non sono stati trattati con terapia HAART (Mellors et al, 1996).

E' stimato che circa la metà delle cellule CD4<sup>+</sup> dell'organismo vengano perse durante l'infezione acuta da HIV; infatti la replicazione virale induce due principali effetti citopatici: la lisi per l'alterazione della permeabilità di membrana conseguente alla continua gemmazione dei virioni e la morte cellulare per l'accumulo di DNA non integrato o per un eccessivo danneggiamento dovuta alla sintesi proteica virale. *In vitro* è stato frequentemente osservata la tendenza delle cellule infette a formare sincizi, benchè queste formazioni si rilevino solo raramente nei pazienti. Tuttavia ceppi virali isolati da pazienti in un avanzato stadio della malattia manifestano una maggiore attività fusogena, suggerendo l'esistenza una relazione fra questo fenomeno e la progressione clinica dell'infezione.

Ruolo importante nei primi mesi è quello svolto dai linfociti T citotossici CD8<sup>+</sup>, che controllano la replicazione virale; infatti nell'infezione acuta esiste un'associazione tra il picco della risposta citotossica specifica nei confronti del virus e la riduzione della viremia, dovuto all'espansione delle cellule CD8<sup>+</sup> in grado di reagire nei confronti di un elevato numero di peptidi virali. Queste cellule sono inoltre in grado di secernere fattori solubili capaci di inibire la replicazione virale: chemochine MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES capaci di bloccare l'ingresso del virus nelle cellule bersaglio. Inoltre possono essere presenti anticorpi contro le proteine esterne del virione che, legandosi alle cellule in cui il virus è in attiva replicazione, ne inducono la distruzione per meccanismi di citotossicità cellulare anticorpo-dipendenti (ADCC). Se il calo di linfociti fosse legato solo agli effetti diretti dell'infezione la perdita effettiva sarebbe inferiore a quella osservata *in vivo* durante la fase di latenza. Questa si spiega completamente solo considerando anche l'azione del virus sulla popolazione linfocitaria sana: si tratta soprattutto di fenomeni apoptotici, innescati sia dalle proteine di origine virale che dalle alterazioni dell'ambiente extracellulare (Alimonti et al, 2003). Le cellule sane, oltre all'apoptosi, possono subire varie alterazioni che, nel complesso, portano ad un peggioramento della funzionalità del sistema immunitario; un ruolo importante è stato assegnato allo stato di attivazione generalizzata di questo compartimento associato alla presenza del virus, che dipende da segnali sia specifici (da parte di HIV ma anche altri agenti patogeni) che aspecifici (Dryden et al, 2005). L'aumento del turnover delle cellule T conseguente a questa situazione ha come risultato l'esaurimento del pool di cellule naive e di cellule della memoria allo stato quiescente e quindi una minore efficienza nella risposta ai patogeni (Silvestri et al, 2003).

L'infezione acuta decorre spesso in modo asintomatico oppure può tradursi nel 50-70% dei casi, entro 2-6 settimane dal contagio, in sintomi simili a quelli di una sindrome influenzale o mononucleosica: astenia, febbre, cefalea, linfadenopatia e, raramente, eruzioni cutanee maculo-papulari, diarrea e vomito; solo in alcuni casi si rilevano manifestazioni cliniche più caratteristiche come ulcere delle mucose del cavo orale

o genitali e un esantema roseoliforme (*sindrome similtonucleosica*). Più raramente la malattia acuta è caratterizzata da una encefalite o da una meningite acuta reversibile (Gurunathan et al, 2009).

### 1.7.2 Infezione cronica e latenza clinica

Mentre la fase acuta è quindi legata all'imponente disseminazione del virus nell'organismo a livello dei bersagli cellulari e degli organi che rappresentano il principale reservoir virale, nella fase cronica si assiste alla lenta deplezione delle cellule T CD4<sup>+</sup> e ad un incremento delle cellule T CD8<sup>+</sup> associati ad uno stato di attivazione cronica del sistema immunitario. Questa fase di latenza clinica è perciò un momento dinamico dell'infezione in cui si bilanciano un'elevata produzione ed eliminazione di particelle virali e un rapido turnover giornaliero di cellule infette. Considerando che il virus può dar luogo a un'infezione latente oltre che produttiva, è verosimile che i due compartimenti si alimentino a vicenda e che in qualunque momento dell'infezione i valori di viremia plasmatica correlino quantitativamente con le cellule HIV-DNA infette. L'accumularsi di cellule latentemente infette rappresenta quindi un enorme serbatoio, progressivamente crescente di potenziali avvii di replicazione produttiva (Varthakavi et al, 2003).

In realtà non si tratta di una vera e propria latenza biologica, in quanto durante questo periodo si assiste alla replicazione virale e alla progressione della malattia, seppure lenta; perciò possono coesistere cellule in cui è presente solo il provirus integrato e cellule in cui invece sono presenti le diverse fasi della replicazione virale. Il sangue periferico quindi non riflette precisamente l'effettivo stato immunologico dell'intero organismo, ma sono gli organi linfoidi (soprattutto linfonodi e cellule dendritiche follicolari) la sede principale della replicazione e propagazione virale. Il sistema immunitario è in larga misura intatto ma vi è una continua replicazione virale a livello dei tessuti linfoidi, che può perdurare per diversi anni (dagli 8 ai 12), la cui manifestazione più evidente a livello periferico è la perdita lenta ma costante di linfociti T CD4<sup>+</sup> e la comparsa di difetti funzionali a carico sia dei linfociti CD4<sup>+</sup> che CD8<sup>+</sup>, sia dei monociti che dei macrofagi, a cui si associa un progressivo deterioramento del sistema immunitario (Fig.1.7). In uno scenario così descritto, le cellule T CD4<sup>+</sup> morirebbero non solo per effetto diretto del virus, ma anche perché crescenti quantità di linfociti *resting* sarebbero indotti a migrare verso i linfonodi dove verrebbero poi eliminati attraverso meccanismi di apoptosi. A conferma di ciò si osserva che nelle fasi che precedono la progressione, i linfonodi sono caratterizzati da un'elevata iperplasia follicolare legata ad uno stato di attivazione cronica indotta da HIV. Il virus è quindi "intrappolato" nei centri germinativi potendo infettare continuamente le cellule CD4<sup>+</sup> che migrano attraverso gli organi linfoidi e ciò rende conto della marcata dicotomia tra il contenuto virale e i livelli di replicazione nel sangue periferico e in questi organi. Tutto questo sottolinea come tale fase, che dura in media 8-10 anni, non sia di "latenza" solo dal punto di vista clinico ma che in realtà si verifica un inesorabile deterioramento delle funzioni immunitarie e una progressiva deplezione dei linfociti CD4<sup>+</sup> anche se i livelli viremici nel plasma appaiono bassi.



Figura 1.7 Compartimenti di attiva replicazione e di latenza.

In questo periodo quindi si assiste ad una progressiva riduzione dei linfociti CD4<sup>+</sup> che però si mantengono superiori ai 500 cell/μL (> 29%). Clinicamente questa fase è asintomatica o si presenta con una linfadenopatia (*Lympho-Adenopatic Sindrome*, LAS). Quando poi la conta linfocitaria scende tra 200 e 500 cell/μL (14-29%) il paziente può rimanere asintomatico o presentare candidosi vaginale, dermatite seborroica e infezioni batteriche quali sinusiti, bronchiti, polmoniti sostenute soprattutto da *H.Influenzae*, *M.Catarrhalis*, *M.Pneumoniae*. In assenza di trattamento farmacologico la maggioranza dei pazienti evolve verso la malattia (in genere quando il livello di linfociti CD4<sup>+</sup> scende sotto il valore 350 cellule/μL). Una quota minore presenta un'evoluzione più rapida (*rapid progressor*) e una porzione, costituita da meno del 10% dei soggetti infetti, ha una tendenza a non ammalarsi anche dopo 12 anni di infezione (*long term non progressor*).

### 1.7.3 Fase sintomatica o sindrome da immunodeficienza conclamata

Il progredire dell'immunodepressione si riflette, come detto, in una diminuzione dei linfociti CD4 (nelle fasi finali meno di 200 linfociti/μL) e in difetti funzionali soprattutto in monociti-macrofagi, mentre la viremia, che in fase asintomatica si era assestata tra 1000 e 10000 copie RNA/ml, aumenta progressivamente fino a 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> copie/ml.

Questo deterioramento conduce alla fase clinicamente sintomatica della malattia che si manifesta inizialmente con linfadenopatia persistente (*Lympho-Adenopatic Sindrom*, LAS), seguito da una fase di perdita di peso, astenia, anemia, febbre, diarrea, ipergammaglobulinemia, che è definita stadio "ARC", ovvero *AIDS-related complex*.

L'insorgenza di infezioni opportunistiche sono la principale causa di circa l'80% dei decessi (Pantaleo et al, 1993). Si tratta spesso di eventi patologici associati alla cute o alle mucose, quali forme gravi di candidosi a livello orale o esofageo, ed infezioni da *Herpes simplex*, che si manifestano con ulcerazioni muco-cutanee nella bocca, nell'esofago, nei genitali esterni e nella regione perianale. Facilmente riscontrabili sono inoltre corio-retiniti, esofagiti e coliti indotte da *Citomegalovirus*, infezioni disseminate da micobatteri atipici e da *Mycobacterium tuberculosis*, polmoniti da *Pneumocystis carinii* e patologie ascrivibili ad altri agenti quali *Cryptococcus neoformans*, *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium*. Il virus

della *Varicella zoster* provoca lesioni in diversi dermatomeri e spesso si complicano con sovrainfezioni batteriche e successiva batteriemia. *Papilloma virus* provoca la comparsa di verruche al volto e alle mani, nonché di condilomi accuminati a livello genitale e anorettale. Il *Mollusco contagioso* determina infezioni soprattutto al volto. Infine *Epstein Barr virus* è responsabile della leucoplachia villosa orale con placche biancastre localizzate in genere al dorso della lingua (Masur et al, 2002). Oltre a tali infezioni, questo stadio può essere caratterizzato dalla comparsa di tumori “indicativi di AIDS” quali il sarcoma di Kaposi, il linfoma cerebrale primitivo, il linfoma di Burkitt e linfomi B a grandi cellule.

## 1.8 La terapia antiretrovirale

Il primo farmaco antiretrovirale approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) è stato l'azidovudina (AZT) nel 1987. Negli anni successivi sono stati validati e introdotti in commercio altri farmaci antiretrovirali capaci di bloccare il ciclo replicativo di HIV in diversi punti (Fig. 1.8).

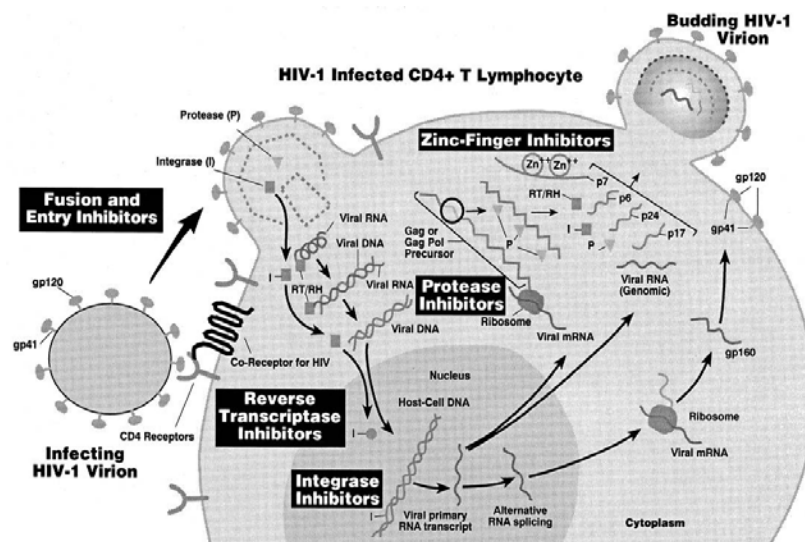


Figura 1.8 Ciclo vitale di HIV e siti di attacco dei farmaci

Nel 1995, con l'introduzione della HAART (*highly active antiretroviral therapy*) che consiste nell'associazione di almeno tre farmaci antiretrovirali, si osservò che l'utilizzo di una terapia combinata di più farmaci consentiva un netto aumento della sopravvivenza e una diminuzione della progressione in AIDS (Moroni et al, 2008). Questo ha comportato un notevole cambiamento nella storia naturale della malattia da HIV; prima dell'introduzione della terapia antiretrovirale (ART), il tempo medio di progressione da contagio ad AIDS era di circa 10 anni e la sopravvivenza media dopo la diagnosi di AIDS di 1.5 anni. Dal 1996, anno in cui la ART si è resa disponibile, studi di coorte e sistemi di sorveglianza hanno mostrato chiaramente la diminuzione dell'incidenza di quasi tutte le infezioni opportunistiche nei pazienti HIV positivi. Inoltre, la storia naturale delle stesse infezioni opportunistiche è

cambiata in maniera significativa. In Italia la sopravvivenza a 24 mesi dopo la diagnosi di una malattia AIDS-definente è più che raddoppiata nei pazienti in cui la diagnosi è stata posta dopo il 1995; il rischio di morte si è ridotto del 55-80% per tutte le malattie AIDS-definienti ad eccezione dei linfomi.

### **1.8.1 Inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI)**

Essi sono in grado di inibire il processo di replicazione del virus interferendo con la funzione polimerasica della trascrittasi inversa virale (Figura 1.8); agiscono sostituendosi alle basi azotate durante la trascrizione del genoma da parte della TI provocando l'arresto precoce della sintesi del cDNA. Infatti gli analoghi nucleotidici vengono incorporati nella catena di DNA provocando l'arresto precoce della sintesi di DNA. Una volta entrati nella cellula bersaglio, questi farmaci devono essere attivati nella forma trifosfato dalle chinasi cellulari in modo da acquisire una elevata affinità per la TI e competere con i substrati naturali dell'enzima (Palmer et al, 1998).

Gli analoghi nucleosidici vengono incorporati nella catena di DNA provocando l'arresto precoce della sintesi di DNA. Gli inibitori nucleotidici della trascrittasi inversa (NtRTI) agiscono allo stesso modo degli NRTI ma richiedono una fosforilazione in meno, essendo attivi nella forma "disolfato".

La Zidovudina (AZT) è un analogo del nucleoside timidina (affinità 100 volte superiore al substrato naturale dell'enzima, dTTP) in cui il gruppo ossidrilico 3' del ribosio è stato sostituito con un gruppo azide impedendo la formazione del legame 3'-5' fosfodiesterico col nucleoside successivo (blocco trascrizione). Altri farmaci appartenenti alla classe degli NRTIs sono: la Didanosina (ddI) che è un nucleoside analogo dell'adenosina; la Zalcitabina (ddC), nucleoside analogo della citosina; la Lamivudina (3TC), nucleoside analogo della citosina; l'Emtricitabina (FTC), nucleoside analogo della citosina; la Stavudina (d4T), nucleoside analogo della timidina; l'Abacavir (ABC), nucleoside analogo della guanosina e il Tenofovir (TDF) che è un analogo nucleotidico dell'adenina.

Gli inibitori nucleosidici e nucleotidici hanno dimostrato gli stessi effetti collaterali ovvero: iperlattatemia asintomatica, acidosi lattica sintomatica e, più raramente epatomegalia con steatosi (Carr. 2003).

### **1.8.2 Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI)**

Gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTIs) sono inibitori non competitivi scoperti una decina di anni fa. Gli NNRTI inibiscono la trascrittasi inversa ma con un meccanismo diverso da quello citato per la classe precedente: si legano direttamente al sito attivo dell'enzima bloccandone l'azione e impedendo così che avvenga la formazione del DNA provirale.

Appartengono a questa classe di farmaci: Delavirdina (DLV), Efavirenz (EFV), Nevirapina (NVP) e Etravirina (TMC 125) (farmaco autorizzato in Italia dal giugno 2009 che attualmente viene riservato a pazienti già trattati e plurifalliti).

Pazienti in monoterapia vanno incontro rapidamente a farmaco resistenza essendo questi farmaci dotati di bassa barriera genetica. Quindi, prima di utilizzarli, è tassativo eseguire un " test di resistenza" per

valutarne il possibile impiego. Sono però stati rivalutati con successo nell'ambito di terapie di combinazione. La loro bontà sta nell'essere farmaci potenti, con buona biodisponibilità e lunga emivita. Gli NNRTIs attualmente utilizzati nella pratica clinica sono: la nevirapina (NVP), la delavirdina (DLV) e l'efavirenz (EFV).

### 1.8.3 Inibitori delle proteasi (PI)

Sono farmaci antiretrovirali in grado di bloccare il clivaggio delle poliproteine, determinato dalla proteasi virale, negli stadi tardivi del ciclo replicativo di HIV, provocando quindi la produzione di particelle virali difettive (Deeks *et al.*, 1997). Infatti il funzionamento di questo enzima è essenziale per il clivaggio di *gag* e *gag-pol* e di numerose proteine del core virale ( RT, proteasi stessa, integrasi, etc.) Quindi tali composti hanno radicalmente modificato l'impatto della terapia antiretrovirale, essendo caratterizzati da una potente attività di blocco della replicazione (Figura 1.8).

Gli inibitori della proteasi che vengono attualmente utilizzati sono principalmente metabolizzati dal complesso enzimatico del citocromo P-450. Possono quindi interferire con il metabolismo epatico di numerosi altri farmaci, agendo come induttori o inibitori del citocromo P-450 (Piscitelli *et al.*, 2001).

Gli inibitori della proteasi attualmente in uso sono: il Saquinavir (SQV); il Ritonavir (RTV), spesso utilizzato in associazione con altri PIs perché capace di aumentarne i livelli ematici attraverso il blocco esercitato sul citocromo P-450; l'Indinavir (IDV); il Nelfinavir (NFV); l'Amprenavir (APV); il Fosamprenavir, profarmaco dell'Amprenavir; il Lopinavir (LPV), disponibile solo in associazione con il Ritonavir, l'Atazanavir (ATV), il Tipranavir (TPV) ed il Darunavir (DRV), questi ultimi due recentemente approvati dalla FDA.

Purtroppo i PI sono gravati da numerosi effetti collaterali determinati dall'uso cronico di questi farmaci come: aumento significativo del colesterolo e trigliceridi nel sangue, iperglicemia e comparsa di diabete mellito. Si sono verificati anche episodi di una sindrome lipoatrofica (perdita del grasso sottocutaneo del volto e degli arti), osteopenia, osteoporosi o osteonecrosi, che spesso portano ad una sospensione del loro utilizzo.

### 1.8.4 Nuove classi di farmaci

Recentemente sono state poi immessi in commercio composti appartenenti a nuove classi di farmaci. Il loro uso per ora è ancora limitato a pazienti che abbiano già fallito almeno due linee di terapia classiche.

**Inibitori dell'integrasi:** il capostipite degli inibitori dell'integrasi è il Raltegravir (RAL), che è l'unico farmaco approvato. Esso va a bloccare l'enzima integrasi impedendo perciò l'incorporazione del DNA provirale nel genoma della cellula ospite e quindi la trascrizione del genoma di HIV ad opera dei meccanismi di replicazione cellulare. L'uso di questo farmaco ha dimostrato la capacità di aumentare la conta delle cellule CD4<sup>+</sup> (Xagena 2008). Viene utilizzato solo per pazienti che hanno sviluppato resistenza a tre classi di farmaci.

**Inibitori della fusione:** sono farmaci antiretrovirali che agiscono legandosi a gp41 inibendone i cambiamenti conformazionali necessari affinché avvenga la fusione tra l'envelope virale e la membrana

cellulare della cellula bersaglio. Sono farmaci che agiscono in fase precoce del ciclo replicativo di HIV (Fig 1.8). Attualmente l'unico farmaco usato è l'Enfuvirtide o T20, peptide sintetico costituito da 36 amminoacidi che mima una parte della struttura del dominio HR2 della glicoproteina gp41 (Clavel *et al.*, 2004). Il legame tra farmaco e HR1 blocca l'interazione tra HR1 e HR2 impedendo quei cambiamenti conformazionali a carico di questa glicoproteina necessari per la fusione tra il pericapside virale e la membrana della cellula ospite.

T20 necessita di una somministrazione sottocutanea ed ha un costo molto elevato, di conseguenza viene utilizzato per pazienti con un'infezione multiresistente non più controllabile con le altre classi di farmaci. In questi soggetti si è osservato un aumento dei linfociti CD4<sup>+</sup> e una riduzione della viremia; risultati migliori sono stati ottenuti dall'associazione di T20 con inibitori della proteasi e retrotrascrittasi verso cui la popolazione virale non era ancora completamente farmaco resistente.

**Inibitori del legame al corecettore CCR5:** i farmaci di questa categoria mirano a bloccare l'entrata del virus nella cellula ospite non legando una componente virale, ma interagendo con il corecettore CCR5 sulla cellula ospite (Vandekerckhove *et al.*, 2008).

## **1.9 DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA HIV**

### **1.9.1 Diagnosi sierologica**

La diagnosi di laboratorio dell'infezione da HIV-1 è basata sulla rilevazione della presenza di anticorpi specifici (test di screening), confermata da un test basato su western o immuno-blotting (test di conferma).

Lo schema generale del protocollo diagnostico (Fig. 1.9) prevede per prima cosa il test per lo screening di base, costituito dalla ricerca di anticorpi anti-HIV nel siero mediante saggio immunoenzimatico ELISA, la quale è dotata di elevata sensibilità a scapito di una specificità leggermente inferiore per non rischiare di ottenere dei falsi negativi (Harrison *et al.* 2005). Tuttavia esiste un periodo, in media di 3 settimane, tra contagio e comparsa dei primi anticorpi e degli studi hanno mostrato che durante questo periodo l'antigene p24 dell'HIV-1 è presente nella maggior parte dei pazienti infettati da HIV-1 (Von Sydow *et al.*, 1988). Attualmente sono disponibili saggi ELISA di quarta generazione che combinano la ricerca dell'antigene p24 e degli anticorpi anti-HIV-1 ed anti-HIV-2, permettendo di ridurre il tempo che intercorre tra il contagio e la diagnostica dell'infezione (periodo finestra). Gli anticorpi specifici per HIV possono essere rilevati entro 2-8 settimane dopo l'infezione. Il tempo necessario per rilevare la sieroconversione dipende da diversi fattori, come il titolo virale, la modalità di trasmissione e la sensibilità del test usato. Generalmente la sieroconversione inizia con la comparsa di IgM specifiche per la proteina gag, poi dopo 5-7 giorni compaiono le IgG specifiche per le proteine virali p24 e gp120. Le prime IgG prodotte sono difficilmente rilevabili con i comuni saggi sierologici, ma aumentano progressivamente nei primi mesi, per poi raggiungere lo stato di *plateau*.

Grazie all'introduzione di sistemi automatizzati e all'impiego di antigeni ricombinanti e sintetici che hanno aumentato la specificità del test, è possibile affrontare il problema della diagnosi di infezione da

ceppi di HIV-1 non appartenenti al sottogruppo principale (main, M), ma facenti parte del sottogruppo O (outlier), e da ceppi di HIV-2; ad esempio, il sottogruppo O raggruppa ceppi di HIV-1 inizialmente circolanti in Camerun e divergenti per circa il 50% della sequenza aminoacidica del gene env dai ceppi comunemente circolanti di sottogruppo M (De Leys et al, 1990). Questo particolare problema diagnostico sta assumendo sempre più importanza con il passare del tempo, soprattutto a seguito del notevole incremento dei flussi migratori dal continente africano verso i Paesi occidentali.

In questi ultimi anni, sono stati introdotti anche saggi rapidi per lo screening degli anticorpi anti-HIV allo scopo di disporre di strumenti diagnostici anche in ambienti poco attrezzati. Il sistema più comune è di tipo *dot blot* (Ravanshad et al, 2006); in questo sistema, una miscela di antigeni adsorbita su una piccola area circolare di una membrana di nitrocellulosa viene fatta reagire con il campione di siero. I reagenti sono aggiunti con un contagocce e il risultato positivo si evidenzia con la comparsa di una macchia circolare colorata. In alternativa, gli antigeni virali possono essere legati a microparticelle di lattice o a globuli rossi, che vengono agglutinati in presenza di anticorpi specifici nel siero.

Nel 2004 come test di screening per le donazioni di sangue e plasma e come ausilio nella diagnosi delle infezioni da HIV-1 e HIV-2 è stato introdotto un saggio sierologico altamente sensibile: l'ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo (Architect System, Germany); il saggio è un dosaggio immunologico a due fasi che utilizza la tecnologia chemiluminescente a cattura di microparticelle (CMIA) con protocolli analitici flessibili, denominati Chemiflex, per la rilevazione qualitativa simultanea dell'antigene HIV p24 e degli anticorpi contro il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (gruppo M e gruppo O) e/o l'HIV-2 in campioni di siero o plasma umano. Il dosaggio non discrimina tra la rilevazione dell'antigene HIV p24 e degli anticorpi anti-HIV-1 o anti-HIV-2.

La proteina immunogenica principale e il target antigenico per la rilevazione nel siero dell'infezione da HIV è la proteina virale transmembrana. Gli anticorpi contro la proteina transmembrana sono regolarmente tra i primi a comparire nella sierconversione in soggetti infetti (Ag/Ab Combo, Architect System, Germany). Le proteine transmembrana provenienti dai gruppi M e O dell'HIV-1 e dell'HIV-2 sono rappresentate nei reagenti ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo da cinque antigeni ricombinanti e due peptidi sintetici provenienti da sequenze di proteine transmembrana originarie. Il principio in base al quale vengono incluse tre coppie di proteine transmembrana sta nella diversità genetica dell'HIV-1 e tra l'HIV-1 e l'HIV-2. Studi sierologici indicano che i virus HIV-1 e HIV-2 hanno molti epitopi comuni a livello degli antigeni del nucleo, mentre le glicoproteine dell'envelope presentano una reattività crociata nettamente inferiore. Gli anticorpi contro le proteine trans membrana di un ceppo virale appartenente ad un determinato gruppo o tipo possono reagire bene, debolmente oppure non reagire affatto con la proteina appartenente ad un ceppo virale di un gruppo o tipo diverso. Gli anticorpi anti-HIV-1 appartenenti al gruppo N possono rappresentare un'eccezione (Ag/Ab Combo, Architect System, Germany, 2004). La proteina strutturale dell'HIV più comunemente usata come marker dell'antigenemia è la proteina core p24. Per rilevare l'antigene HIV p24 prima della sierconversione, il dosaggio ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo utilizza anticorpi anti-HIV p24, riducendo in tal modo la finestra di sierconversione e



migliorando la rilevazione precoce dell'infezione da HIV. La presenza o assenza dell'antigene HIV p24 o degli anticorpi anti-HIV-1/HIV-2 nel campione viene determinata confrontando il segnale chemiluminescente della reazione con il segnale cutoff determinato da una calibrazione ARCHITECT HIV Ag/ab Combo. La reazione chemiluminescente viene misurata in unità di luce relativa (RLU); i campioni che presentano valori ( $S/CO = RLU \text{ campione}/RLU \text{ valore limite}$ ) pari o superiori a 1.00 sono considerati reattivi per l'antigene HIV p24 o per gli anticorpi anti-HIV-1 e/o anti-HIV-2. Campioni con valori S/CO inferiori a 1.00 sono considerati non reattivi per l'antigene HIV p24 o per gli anticorpi anti-HIV-1/HIV-2 (Suligo et al, 2008).

I campioni che risultano essere inizialmente reattivi con il dosaggio ARCHITECT devono essere rianalizzati in duplicato. Un campione ripetutamente reattivo deve essere ulteriormente analizzato mediante test sensibili supplementari specifici per l'HIV, quali *Western Blot*, test antigenici e test degli acidi nucleici dell'HIV.

Quando i risultati del test ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo di pazienti sconosciuti danno valori compresi tra 1 e 50, solitamente le analisi vengono ripetute con il test VIDAS HIV DUO Ultra (Bourlet et al, 2005).

VIDAS HIV DUO Ultra è un test per lo screening dell'infezione da HIV, automatizzato sugli strumenti VIDAS, che permette la rilevazione combinata delle immunoglobuline totali anti-HIV-1 (gruppo M ed O) ed anti-HIV-2 e dell'antigene p24 dell'HIV-1 nel siero o nel plasma umani con la tecnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) che permette di ridurre la finestra sierologica.

Il principio del dosaggio associa 2 reazioni immunoenzimatiche a 2 rivelazioni finali in fluorescenza (ELFA). I valori del test vengono calcolati per ogni risultato degli anticorpi e degli antigeni dal sistema VIDAS come: Valore del test = RFV del paziente del risultato specifico/RFV dello standard specifico; valori  $< 0.25$  sono considerati negativi e valori  $\geq 0.25$  sono considerati positivi.

I campioni la cui interpretazione è positiva devono essere rianalizzati in doppio: i campioni ripetibili devono essere confermati con metodi complementari, come il *Western Blot* e/o una seconda tecnica di screening degli anticorpi anti-HIV (per quanto riguarda la rivelazione degli anticorpi), e il test di ricerca dell'antigene p24 e/o sulla determinazione della carica virale (per quanto riguarda la rilevazione dell'antigene).

Qualunque sia il saggio di screening utilizzato, bisogna considerarne i limiti; la comparsa degli anticorpi anti-HIV richiede un certo tempo prima che gli anticorpi siano evidenziabili; in questa fase, l'approccio sierologico non è in grado di documentare l'avvenuta reazione. D'altra parte, la necessità di disporre di una sensibilità molto elevata va a scapito della specificità di questi saggi. Pertanto, ogni risultato positivo ottenuto con una metodica di screening deve essere ricontrrollato e poi sottoposto a un saggio di conferma (Fig. 1.9).

### **1.9.1.1 Saggi di conferma**

Nel monitoraggio sierologico è obbligatorio confermare o infirmare la risposta dei test di monitoraggio mediante tecniche ulteriori. Gli esperti dell'OMS raccomandano le tecniche di immunoblotting o *Western*

Blot, che consente di evidenziare la presenza di anticorpi diretti verso le singole proteine virus-specifiche, separate mediante elettroforesi in base al peso molecolare e trasferite su strisce di nitrocellulosa. Attualmente attraverso il kit NEW LAV BLOT I (Biorad, France) (Grady et al, 1993) è possibile documentare la cinetica di comparsa degli anticorpi specifici per le singole proteine virali nel siero di soggetti con infezione recente; tuttavia quando si mette in evidenza una positività ristretta ad alcune bande, si pone la necessità di adottare criteri interpretativi nella lettura dei risultati del saggio. Non è stato ancora raggiunto a livello internazionale un consenso unanime su una definizione consensuale di positività al saggio Western blot.

I tre criteri interpretativi più comunemente adottati prevedono: la reattività per almeno una proteina del core (p24) e una dell'envelope (gp41, gp120 o gp160) (Stati Uniti, CDC); la reattività per p24, p32, e gp41 o gp120/160 (Stati Uniti, FDA); la reattività per almeno due glicoproteine dell'envelope: gp41, gp120, gp160 (Organizzazione Mondiale della Sanità).

Di regola un campione viene considerato negativo se non viene evidenziata reattività per nessuna delle proteine virali, mentre viene considerato indeterminato o dubbio se presenta una reattività che non rientra nei criteri di positività sopra riportati. Quindi, nel caso di positività per una sola proteina e quindi ad un risultato indeterminato, è necessario ripetere l'esame su un nuovo campione prelevato a distanza di circa 1 mese, in quanto tale risultato può talora essere indicativo di sierconversione. Tuttavia, gran parte dei risultati indeterminati rimangono tali nel tempo o diventano successivamente negativi. Al fine di superare almeno in parte il problema dei risultati indeterminati, negli ultimi anni sono stati introdotti saggi che utilizzano, al posto di un lisato virale come nel Western blot classico, proteine virali ricombinanti o peptidi sintetici corrispondenti alle principali proteine virali, e adsorbiti separatamente su strisce di nitrocellulosa (*line immunoassay*, *INNO-LIA HIV*, Innogenetics, Ghent, Belgio). Su queste strisce sono presenti 5 antigeni di HIV-1: gp120, gp41, p31, p24, p17. Gli antigeni gp36 e gp105 permettono la rilevazione degli anticorpi specifici per HIV-2. Sono inoltre presenti quattro bande di controllo, di cui una costituita da anticorpi anti-IgG umane, per verificare l'avvenuta dispensazione del campione di siero, e due costituite da IgG umane a diversa concentrazione per definire il livello di positività.

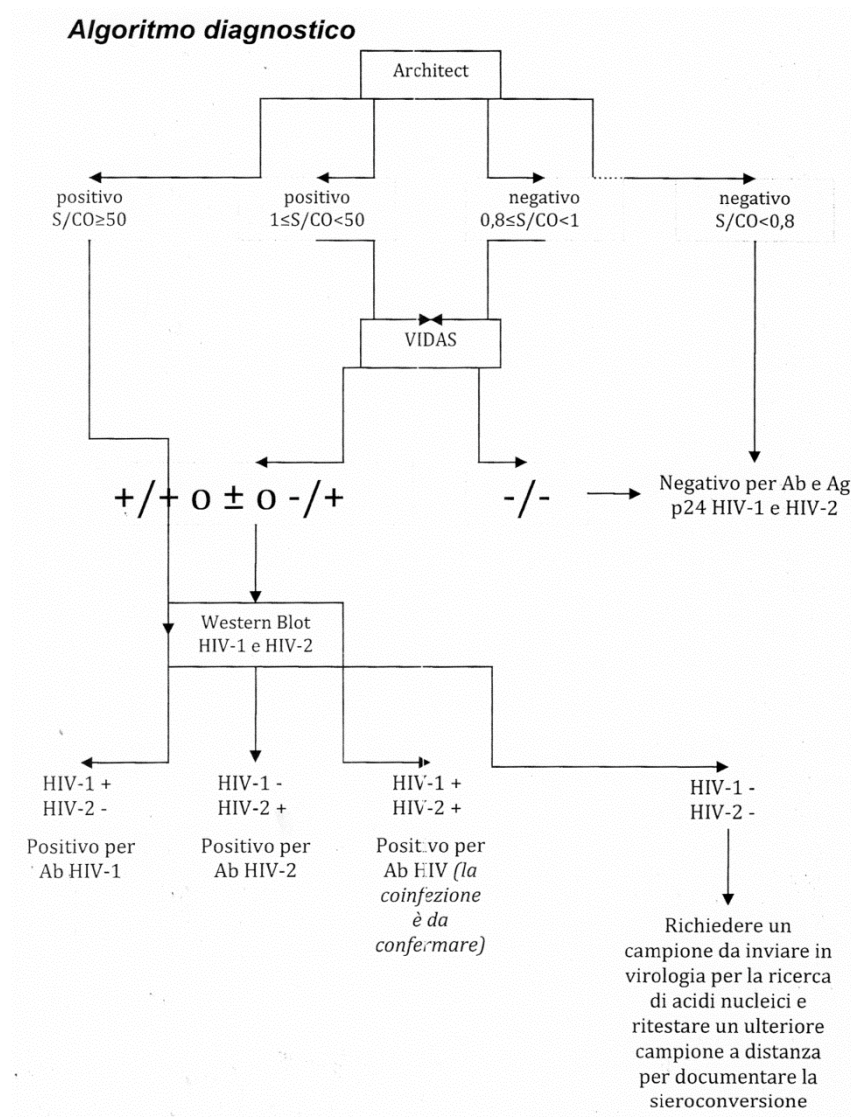


Figura 1.9 Rappresentazione grafica dei test di laboratorio da effettuare per una diagnosi sierologica corretta per l'infezione da HIV.

Infine, la banda costituita da streptavidina ha lo scopo di evidenziare eventuali reattività aspecifiche e la sua positività rende non interpretabile il risultato ottenuto. L'aggiunta nel kit NEW LAV BLOT II di un peptide sintetico corrispondente a gp34 di HIV-2 consente di estendere la diagnosi anche all'infezione da HIV-2 (Grady et al, 1993).

La ricerca sierologica di anticorpi anti-HIV consente una sicura diagnosi ad eccezione di alcuni casi:

- a) nella fase iniziale dell'infezione (periodo finestra 3-4 settimane, tempo necessario perché si sviluppino una quantità sufficiente di anticorpi affinché possano essere rilevati);
- b) nei bimbi nati da madri infette, poiché possiedono anticorpi sierici anti-HIV di origine materna (IgG), di nessun valore diagnostico;
- c) nei soggetti che dalle indagini sierologiche risultano 'borderline' (dubbia positività).

In questi casi è necessario ricorrere ad indagini virologiche in grado di evidenziare la presenza del virus in

forma attiva o latente attraverso l'isolamento del virus in colture cellulari *in vitro* o attraverso la dimostrazione della presenza di antigeni virus-specifici (p24) o la ricerca dell'RNA plasmatico o del DNA provirale.

L'isolamento del virus in colture cellulari è una tecnica indagativa e richiede tempi piuttosto lunghi e laboratori attrezzati; più semplice è il test sierologico di conferma per la rivelazione dell'antigene p24. Il test VIDAS HIV p24 II (bioMérieux, Lyon, France) ( Miedouge et al, 2011); è un test quantitativo, automatizzato sugli strumenti VIDAS, che permette la ricerca dell'antigene p24 del virus HIV-1, nel siero o nel plasma umano con la tecnica ELFA. L'antigene p24 è generalmente rilevabile nel siero due settimane dopo la contaminazione del soggetto con l'HIV-1. La sua presenza riflette un'intensa replicazione virale. La prescrizione della sua ricerca nei soggetti a rischio può permettere una diagnosi precoce nei pazienti in fase di pre o di post-sieroconversione. Nei bambini nati da madre HIV-1 sieropositiva, la presenza di antigene p24 nel supernatante della coltura del virus fin dalla nascita, sarebbe predittiva di forme precoci e gravi della malattia. Dopo un picco raggiunto alcune settimane dopo l'infezione, l'antigene p24 generalmente non è più rilevabile nel sangue. La sua ricomparsa o il suo aumento, associati alla diminuzione del tasso di anticorpi anti-p24, costituiscono uno dei criteri di progresso sfavorevole dell'infezione. La presenza di anticorpi specifici nel siero di soggetti infetti, con conseguente formazione di immunocomplessi, può mascherare la presenza di p24 impedendone l'evidenziazione. Per ovviare a questo inconveniente, sono state messe a punto procedure che prevedono il trattamento del campione a pH acido, onde dissociare gli immunocomplessi prima dell'esecuzione del saggio. Attualmente, l'utilità della ricerca dell'antigene p24 consiste nel rilevamento precoce dell'infezione da HIV. Il valore di fluorescenza residua (RFV) è interpretato dal sistema VIDAS; i risultati sono espressi in pg/mL di Ag p24 o in pg/mL di Ag HIV (1 pg/mL di Ag p24 = 3,65 pg/mL di Ag HIV). La specificità del test è virtualmente del 100%; questo livello di specificità dipende dall'uso della procedura di neutralizzazione per confermare il test iniziale positivo tramite il test VIDAS HIV p24 II Confirmation (Yerly et al, 1999). Nella procedura di neutralizzazione il campione di siero viene fatto reagire con un anticorpo anti-p24 e quindi sottoposto nuovamente al saggio. Sulla base dei risultati della combinazione dei saggi descritti, il campione è considerato veramente positivo per l'antigene p24 se il livello di antigene p24 è ridotto dal pretrattamento con l'anticorpo. La procedura di dissociazione degli immunocomplessi non è richiesta quando il test viene eseguito nelle infezioni acute in quanto gli anticorpi non sono ancora presenti. Con i test attuali per la rilevazione degli anticorpi, il periodo finestra è stimato essere di 22 giorni (con un intervallo di confidenza del 95%, da 9 a 34 giorni); il periodo finestra per l'antigene p24 è stimato di 16 giorni. La bassa sensibilità offerta da questo metodo ha limitato sempre più il suo utilizzo per il monitoraggio dell'infezione da HIV a favore di procedure di diagnostica molecolare mirate alla ricerca del genoma di HIV nel plasma. Anche nel caso di diagnosi di infezione a trasmissione verticale, le metodiche molecolari di evidenziazione del DNA provirale di HIV nei PBMC dei neonati risultano più affidabili e sensibili.

## 1.9.2 Monitoraggio virologico dell'infezione da HIV

Il monitoraggio del paziente in terapia rappresenta un passaggio cruciale nel controllo dell'infezione da HIV e nel rallentare il più possibile la sua progressione ad AIDS: per fare ciò, le evidenze cliniche si basano essenzialmente sulla misurazione della viremia plasmatica (viral load) e sulla quantificazione della conta di linfociti T CD4<sup>+</sup>, sia assoluta che percentuale (Thompson et al., 2010; European AIDS Clinical Society, 2011). Esperimenti condotti nel corso degli anni 90' hanno mostrato che i livelli di carica virale coprono un ampio range dinamico, che correla bene con lo stato clinico, e riflettono la storia naturale dell'infezione: la carica virale è più alta nella fase acuta dell'infezione e nella fase tardiva della malattia, mentre è intermedia nello stadio clinico asintomatico. In un individuo con infezione da HIV, il genoma virale diventa misurabile nel plasma circa 11 giorni dopo il contagio e raggiunge una concentrazione estremamente elevata nei giorni successivi, per tutta la durata della fase acuta (Fig. 1.10). Durante le settimane e i mesi successivi alla fase acuta, l'interazione tra HIV e il sistema immunitario dell'ospite determina lo stabilizzarsi dei livelli plasmatici di RNA virale intorno a un determinato valore medio. Il set point della carica virale si stabilisce generalmente 6-9 mesi dopo l'infezione e rimane relativamente stabile per lungo tempo, mostrando in assenza di terapia antiretrovirale un lento e graduale incremento, apprezzabile soltanto nell'arco di anni. Nello stadio finale della malattia, i livelli di RNA plasmatico raggiungono valori estremamente elevati.

La misura della carica virale plasmatica è molto utile nella pratica clinica, in quanto fornisce molteplici indicazioni sull'intensità di replicazione virale, la velocità di progressione della malattia e l'efficienza della terapia antiretrovirale.

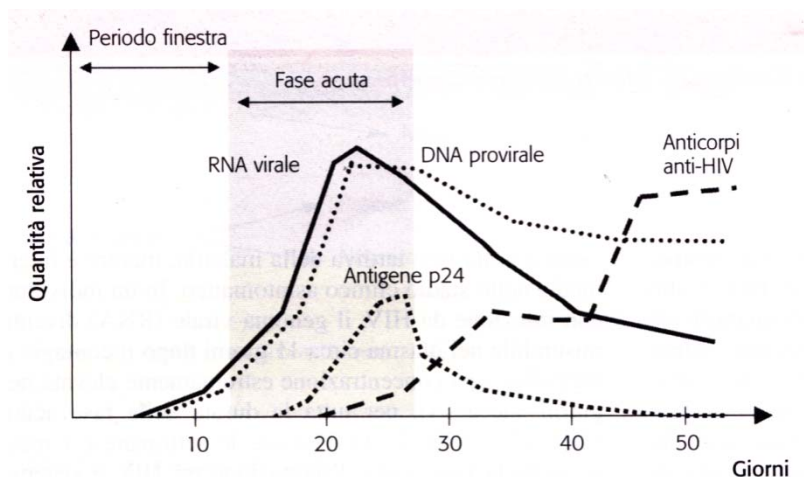


Figura 1.10 Andamento dei marcatori virologici nel corso di infezione primaria di HIV

### 1.9.2.1 Viremia plasmatica

La disponibilità di efficaci terapie antiretrovirali per il trattamento dell'infezione da HIV-1 ha reso necessario il monitoraggio dell'infezione e della risposta alla terapia. Il marcatore surrogato di replicazione virale più largamente utilizzato è la determinazione quantitativa della carica virale

plasmatica mediante quantificazione di HIV-RNA genomico nel plasma (marcatore prognostico) (Mellors et al, 1997).

Se la diminuzione della carica virale, è indice di controllo della replicazione del virus da parte del trattamento, un suo aumento può essere invece considerato nella maggior parte dei casi indice di scarsa efficacia della terapia, spesso dovuta all'emergenza di ceppi di HIV-1 resistenti ai farmaci antiretrovirali. Per questo, il dosaggio dei livelli di HIV-RNA nel plasma è oggi indispensabile per l'ottimizzazione individuale del trattamento antivirale (Haubrich et al, 2011); infatti la terapia HAART si pone come obiettivo il raggiungimento di valori di viremia non rilevabile (Santoro et al, 2013).

Per quanto l'unità di misura riconosciuta come standard internazionale per la misura della viremia sia in unità internazionali, la misura della viremia viene ancora largamente espressa in copie/ml. Sono attualmente disponibili in commercio quattro principali sistemi diagnostici per la quantificazione di HIV-1 RNA plasmatico. Attualmente in commercio si possono trovare tre principali sistemi diagnostici per la quantificazione di HIV-RNA plasmatico: l'*Amplicor HIV-Monitor COBAS/Taqman HIV-1 v2.0* (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA), l'Abbott m2000 Real time HIV-1 (Abbott Laboratories, Illinois, USA), il *Branched-chain DNA* o bDNA (Versant HIV-RNA 3.0, Bayer Diagnostica, Emerville, CA), e il *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification* (NASBA) (Nuclisens, EasyQ HIV-1, BioMerieux, Marcy L'Etoile, France). Tutti i metodi di rilevazione con amplificazione mediante real time, presentano il vantaggio di una significativa riduzione dei tempi di lavoro e per il momento non risultano differenti in termini di sensibilità e riproducibilità; inoltre non vi sono evidenze che indichino differenze, tra le diverse metodiche, in termini di capacità di misurazione della viremia sostenuta da ceppi appartenenti a diversi sottotipi. Tuttavia l'aumento di infezioni sostenute da ceppi non-B in Italia richiede ulteriori approfondimenti per confermare la riproducibilità dei vari metodi per i sottotipi non-B. Recentemente, di notevole interesse, è stato discutere delle differenze nelle diverse metodiche della riproducibilità dei dati ottenuti vicino al limite inferiore di sensibilità; tuttavia questa problematica richiederà ulteriori approfondimenti (Karasi et al, 2011; Sauné et al, 2013).

### **1.9.2.2 Viremia residua**

Molto più discussa e di interesse scientifico, dato che sembra avere notevole importanza a livello clinico, è la valutazione della viremia residua (al di sotto delle 50 copie/ml, fino ad 1 copia/ml); ad oggi sono disponibili solo metodiche *home made*, non sufficientemente standardizzate (Yukl et al, 2011; Charpentier et al, 2012).

In seguito all'introduzione del monitoraggio della carica virale nel 1996, è stato possibile definire il livello di soppressione target utilizzando come riferimento le proprietà tecniche dei saggi commerciali disponibili, e tale livello era inizialmente di 400/500 copie/ml per i saggi di prima generazione, poi abbassato a 50/75 copie/ml con i saggi di seconda generazione. Prove evidenti ottenute da diversi trials clinici hanno dimostrato che il raggiungimento e il mantenimento di una carica virale inferiore alle 50 copie/ml è associato

ad una sostenuta soppressione della carica virale plasmatica nel corso di periodi di follow-up prolungati. L'obiettivo principale della terapia antiretrovirale moderna pertanto è quello di mantenere livelli di HIV RNA plasmatici inferiori alle 50 copie/ml per il periodo più lungo possibile, sia in pazienti che affrontano il loro primo trattamento (first-line therapy) sia in pazienti che hanno già avuto un fallimento terapeutico (Thompson et al., 2010). Tuttavia, è stato anche dimostrato come pazienti con livelli di viremia plasmatica inferiori a 50 copie/ml mantengano un certo grado di viremia residua, ed è oggetto di dibattito l'effetto che tale viremia residua (1-49 copie/ml) possa avere sul rischio di fallimento terapeutico (Gianotti et al., 2012). Ad oggi sono disponibili saggi di terza generazione che permettono di ottenere un limite di quantificazione di 20 copie/ml e sono in grado di offrire anche la rilevazione qualitativa di RNA virale al di sotto di tale cutoff.

Studi recenti (Gianotti et al., 2012) sembrano indicare che non ci sia una diretta correlazione tra la viremia residua e la riattivazione della replicazione virale, con conseguente fallimento terapeutico, e tali risultati supportano l'ipotesi che la viremia residua si origini dalla attivazione occasionale di cellule infettate latentemente (reservoirs) piuttosto che da un'attiva replicazione virale plasmatica.

Va comunque considerato che la definizione, l'origine e la gestione della viremia residua sono ancora poco studiate e poco comprese e che ulteriori studi sono necessari per definire le migliori modalità per la rilevazione e l'intervento terapeutico. Se da una parte infatti la rilevazione della viremia residua con i moderni saggi di rilevazione potrebbe aiutare nel predire il rischio di riattivazione virale e, quindi, un fallimento della terapia, dall'altra parte esistono ancora poche prove del rapporto costi/benefici di tale monitoraggio (Doyle et al., 2012).

### **1.9.2.3 Isolamento virale**

L'isolamento di HIV-1 dal sangue di pazienti non sottoposti a terapia antiretrovirale consente di porre diagnosi di certezza di infezione da HIV-1. In particolari situazioni, quali l'infezione congenita in nato da madre sieropositiva o il riscontro di una sierologia indeterminata per HIV-1 in un soggetto adulto, l'isolamento virale, associato all'evidenziazione diretta degli acidi nucleici di HIV, risulta indispensabile ai fini diagnostici. Tuttavia, l'isolamento di HIV è una procedura complessa che richiede l'impiego di personale qualificato, laboratori con alto livello di contenimento e lunghi tempi di esecuzione. Tali limitazioni non hanno consentito l'adozione di tale procedura su base routinaria.

Il saggio richiede un prelievo di sangue trattato con anticoagulante (EDTA, sodio- o litio-citrato), da cui le cellule mononucleate vengono separate su gradiente di *Ficoll-HyPaque Plus* (GE Helthcare, Svezia). Una volta separati,  $5 \times 10^6$  PBMC del paziente vengono co-coltivati con  $5 \times 10^6$  PBMC ottenuti da un *pool* di donatori sani e stimolati con fitoemoagglutinina-P (PHA-P); il terreno viene rimosso dalla coltura due volte la settimana e testato per valutare la presenza di p24, come indice di attiva replicazione virale. Cellule da donatore sano ( $1 \times 10^6$  PBMC/mL), stimolate con PHA-P, vengono aggiunte alla coltura una volta alla settimana. L'isolamento si considera positivo, in caso di presenza di p24 in due successive determinazioni, o con esito negativo, dopo quattro settimane dall'inoculo e ripetuti saggi negativi per p24. L'identificazione virale viene eseguita mediante l'impiego di anticorpi monoclonali HIV-1 specifici e test

di immunofluorescenza indiretta sui leucociti mononucleati della coltura.

### 1.9.3 Diagnosi immunologica

La quantificazione della conta linfocitaria T CD4<sup>+</sup> (immunofenotipo T CD4<sup>+</sup>) è a oggi il marcatore immunologico prognostico validato all'interno di studi controllati randomizzati. Essa fornisce indicazioni importanti per decidere quando iniziare la terapia antiretrovirale oppure per controllare se i farmaci stanno effettivamente funzionando. A fronte di numerosi studi non randomizzati o di coorte che hanno indagato il possibile ruolo aggiuntivo di marcatori di immunoattivazione ed infiammazione sistemica, nessun marcatore è stato attualmente validato e dunque non è utilizzabile nella gestione clinica del paziente con HIV.

In una persona non affetta da HIV, il valore dei CD4<sup>+</sup> oscilla tra 450 e 1600, ma è un dato che può oscillare notevolmente di caso in caso; le donne, per esempio, hanno livelli tendenzialmente più alti degli uomini.

In soggetti non trattati con terapia antiretrovirale, i T CD4<sup>+</sup> si riducono approssimativamente del 4%/anno. In risposta alla terapia, l'incremento è variabile tra le 50-100 cellule/ $\mu$ L/anno in quei pazienti con sostenuta risposta virologica. In una quota considerevole di soggetti (25%), questo incremento può non essere osservato del tutto o può essere di entità inferiore o fluttuante; inoltre il recupero della conta T CD4<sup>+</sup> si è dimostrato fortemente associato al nadir dei T CD4<sup>+</sup>; non sembra esserci differenza nell'entità del recupero dei T CD4<sup>+</sup> in risposta a diversi regimi terapeutici. Se la conta dei CD4 scende al di sotto di 350, solitamente si raccomanda di iniziare la terapia antiretrovirale. E' infatti dimostrato che utilizzare questo valore soglia come riferimento per l'inizio della terapia presenta una serie di vantaggi, non ultimo maggiori probabilità di un recupero del sistema immunitario fino a condizioni normali e minori probabilità di contrarre malattie opportunistiche e gravi patologie.

Se i valori di CD4 risultano inferiori a 200, è il caso di prendere seriamente in considerazione di iniziare il trattamento anti-HIV e di affiancargli una terapia profilattica, ossia mirata a ridurre il rischio di malattie collaterali, come ad esempio un ciclo di antibiotici per prevenire la polmonite da *Pneumocystis carinii*.

Le linee guida italiane del Novembre 2013, suggeriscono un inizio più precoce della terapia con un risultato dei CD4 inferiore ai 500 cell/ $\mu$ L; questa raccomandazione è fortemente raccomandata nel caso di: patologie concomitanti come epatite e diabete, alto rischio di malattia cardiovascolare, età che supera i 50 anni, gravidanza, relazione con un partner sieronegativo (infatti il trattamento riduce il rischio di trasmissione del virus per via sessuale). In genere se la conta dei CD4 all'inizio del trattamento era bassa, è più probabile che il recupero sia più lento. Durante il trattamento, il test della conta dei CD4 deve essere ripetuto una volta ogni tre/quattro/sei mesi, insieme a quello della carica virale.

Oltre alla vera e propria conta del numero di cellule CD4 nel sangue, talvolta viene misurata la cosiddetta percentuale di CD4 (quantità di CD4 in rapporto al numero totale di globuli bianchi); ad esempio quando da un esame all'altro si riscontra una forte variazione del valore assoluto di CD4.

Comorbidità e terapie concomitanti possono portare a variazioni del numero totale dei globuli bianchi, e



conseguentemente del numero totale dei linfociti T CD4<sup>+</sup>, senza però che sia modificata la percentuale, che può quindi rappresentare un parametro di ausilio nella valutazione dell'effettivo stato immunologico del paziente. Anche per queste ragioni, attualmente si ritiene che la conta percentuale dei T CD4<sup>+</sup> debba essere valutata congiuntamente alla conta assoluta dei T CD4<sup>+</sup> come marcatore di funzione del sistema immune (indicativamente, in una persona sieronegativa la percentuale si attesta intorno al 40%. In termini di rischio di sviluppare patologie, una percentuale di CD4 intorno al 14% è considerata equivalente ad un valore assoluto di 200 cell/μL, mentre al di sopra del 29% equivale ad una conta dei CD4 superiore a 500 cell/μL (Ledergerber et al, 2004)). Inoltre, la progressione clinica dell'infezione da HIV è stata associata a basse conte percentuali dei T CD4<sup>+</sup> anche in pazienti con conte assolute elevate.

### **1.9.3.1 Marcatori immunofenotipici e solubili aggiuntivi**

Da alcuni anni il dibattito scientifico si interroga sulla possibilità di utilizzare marcatori immunologici aggiuntivi che possano affiancare la quantificazione delle cellule T CD4<sup>+</sup>. In considerazione del ruolo patogenetico dell'iperattivazione immune nella storia naturale dell'infezione da HIV-1, l'attenzione è volta all'identificazione di marcatori di immunoattivazione che possano meglio rappresentare il danno immunologico e gli effetti della terapia sul recupero immunologico (Hunt et al, 2011; Sandler et al, 2011; Kuller et al, 2008) (ed eventualmente spiegare ed approfondire il fenomeno della mancata ricostituzione immunologica nei pazienti cosiddetti "*immunological non responders*"). Va tuttavia sottolineato che, sebbene alcuni marcatori si siano dimostrati efficaci nella caratterizzazione di aspetti patogenetici dell'infezione da HIV, al momento un loro utilizzo clinico non è supportato da risultati che possano in qualche modo influenzare eventuali scelte o strategie terapeutiche.

### **1.9.4 Diagnosi molecolare**

Data l'ottima correlazione con la presenza di anticorpi specifici, con la presenza di p24 e con l'isolamento virale, la diagnosi molecolare di infezione da HIV-1 è particolarmente indicata in caso di sospetta infezione in soggetti ancora sieronegativi, oppure in presenza di risultati sierologici indeterminati, oltretutto in caso di sospetta infezione da HIV-1 nei neonati da madre sieropositiva. In questi casi, la ricerca di HIV-RNA nel plasma può essere effettuata parallelamente alla ricerca di HIV-DNA (Linee guida italiane, 2013).

Mediante la tecnica di amplificazione genica (PCR) del genoma virale dell' HIV (regione *pol*), è possibile determinare la presenza del virus sia nel sangue che nel liquido amniotico o nei villi coriali, con una sensibilità che arriva sino a 5 cellule infettate su 50.000 non infettate.

#### **1.9.4.1 I test di resistenza**

Il test di resistenza rappresenta uno strumento diagnostico irrinunciabile per un corretto approccio terapeutico finalizzato al mantenimento prolungato della soppressione virologica e dell'omeostasi immunitaria e clinica. Sono disponibili test di resistenza sia genotipici che fenotipici. I test standard forniscono informazioni sulla resistenza agli inibitori della proteasi (PR) e a quelli della trascrittasi inversa (RT, di analoghi nucleosidici e non-nucleosidici). Sono disponibili anche test per la valutazione

della resistenza agli inibitori dell'integrasi (INI) e agli inibitori della fusione (IF), nonché test per la determinazione del tropismo co-recettoriale di HIV-1 (Linee guida italiane, 2013).

Nonostante la variabilità genetica tra i diversi sottotipi di HIV-1 (fino al 12% della sequenza nucleotidica), ad oggi non ci sono dati clinici che suggeriscano una particolare cautela diagnostica e terapeutica nei confronti di ceppi diversi dal sottotipo B (Santoro e Perno, 2013). Una valutazione della presenza di farmaco resistenza a livello del DNA provirale appare utile in situazioni in cui la determinazione su RNA plasmatico non fosse possibile o desse risultati non soddisfacenti (Parisi et al, 2007).

Un test di resistenza genotipico ( o “genotipo”) analizza la struttura genetica del virus per determinare i cambiamenti rispetto al ceppo originario (ceppo selvaggio). Determinate mutazioni sono associate alla resistenza a precisi farmaci. Esaminando i cambiamenti della struttura genetica del virus rispetto a queste mutazioni è possibile capire abbastanza chiaramente quali farmaci potrebbero funzionare e quali no (Corzillius et al, 2004). Sebbene questi test non riescano a mettere in evidenza livelli molto bassi di resistenza, rappresentano comunque una guida essenziale per scegliere i farmaci della nuova combinazione. Sebbene il test genotipico non sia in grado di determinare quali farmaci funzioneranno, esso è comunque in grado di individuare i farmaci che certamente non funzioneranno: un' informazione fondamentale per costruire una terapia efficace.

Il test di resistenza fenotipico (o "fenotipo") analizza la reazione del virus della singola persona messo a contatto con un farmaco in provetta. Il test è in grado di determinare quanto la persona singola sia sensibile (o resistente) ad un determinato farmaco, individuando quelli che stanno ancora funzionando e/o che in futuro potrebbero funzionare. I risultati esprimono quanto il virus della persona sia più resistente al farmaco rispetto ad un ceppo completamente sensibile; per esempio, una resistenza di "10 volte" ad un farmaco significa che si dovrebbe usare un dosaggio dieci volte superiore per ottenere lo stesso risultato che è possibile ottenere sul ceppo selvaggio. Il test fenotipico è raccomandato quando il test di resistenza genotipico non è in grado di fornire un risultato sufficientemente chiaro ed accurato (Sax et al, 2005). Rispetto al genotipo i costi sono superiori e sono necessarie più settimane prima di ottenerne i risultati. Per finire, il test del fenotipo virtuale si basa sui risultati di un test genotipico correlato ad una banca dati che raccoglie i risultati di migliaia di test fenotipici.

#### **1.9.4.2 Determinazione quantitativa dell'HIV-DNA virale**

I sistemi di misura di HIV-DNA virale, disponibili come metodiche di Real-Time PCR, sono effettuati secondo protocolli pubblicati, nell'ambito di laboratori di ricerca (De Rossi et al, 2010; Rozera et al, 2010; Parisi et al, 2011), ma non sono attualmente disponibili in formulazioni commerciali approvate da Autorità Regolatorie. Sono disponibili numerosi studi sul carico del HIV-DNA virale nelle cellule mononucleate del sangue periferico. Recenti studi hanno evidenziato una correlazione tra la quantità di HIV-DNA provirale e la viremia residua in pazienti trattati con cART e in successo terapeutico (Chun et

al, 2011). I livelli al baseline di HIV-DNA sono anche associati al raggiungimento di livelli non rilevabili sia di HIV-RNA (viremia plasmatica) che di HIV-DNA in pazienti naïve che iniziavano un cART (Parisi et al, 2011). Infine, esiste una correlazione livelli di HIV-DNA e rischio di fallimento virologico in pazienti che hanno semplificato la terapia (Sarmati et al, 2007). Mancano consistenti dati da studi longitudinali che permettano di considerare l'HIV-DNA un marcatore surrogato nella pratica clinica.

## 1.10 Il FOLLOW-UP del paziente infetto

Il monitoraggio del paziente in terapia rappresenta un passaggio cruciale nel controllo dell'infezione da HIV e nel rallentare il più possibile la sua progressione a AIDS (Durante et al, 2003) . Secondo le linee guida, l'unica raccomandazione è eseguire sempre un test genotipico di resistenza nel paziente non trattato (naive) alla diagnosi o comunque prima di iniziare qualsiasi regime terapeutico (Hirsch et al, 2000). Una volta iniziata la terapia il monitoraggio dell'infezione si basa essenzialmente sulla misurazione della viremia plasmatica (*viral load*) e sulla quantificazione della conta di linfociti T CD4<sup>+</sup>, sia assoluta che percentuale (Thompson et al., 2010; European AIDS Clinical Society, 2011) ; in genere la carica virale scende sotto le 50 copie/mL nel giro di 24 settimane e questo in effetti è rappresenta l'obiettivo fondamentale del trattamento. Una volta confermata la soppressione della viremia, ogni 3-4 mesi quest'ultima va monitorata insieme alla conta delle cellule CD4<sup>+</sup> (numero assoluto e percentuale). Episodi isolati di viremia sopra le 50 copie/mL (*blips*) non sono indicativi di fallimento virologico; tuttavia non lo si può dire se tali *rebound* sono consistenti e magari consecutivi. La riesecuzione di un test di resistenza trova giustificazione in caso di sospetto fallimento virologico. Nel corso del trattamento va valutata con attenzione la comparsa di effetti collaterali (clinici e di laboratorio) e l'evoluzione di eventuali patologie concomitanti che possono ostacolare l'adesione alla terapia.

La decisione di cambiare regime terapeutico può essere dettata soprattutto da due motivi: per ridurre la tossicità della terapia e/o effettuare una semplificazione della stessa al fine di aumentare la *compliance* del paziente; a causa del fallimento virologico dovuto all'instaurarsi di resistenze nei confronti dei farmaci utilizzati. Spesso i pazienti sono poco aderenti al trattamento, o sono costretti a sospenderlo per molteplici effetti collaterali e questo, oltre al basso livello di penetrazione dei farmaci in alcuni distretti corporei e alla variabilità farmacocinetica individuale, favorisce l'insorgere di mutazioni di resistenza. In un tale contesto, soprattutto dopo il fallimento di diverse linee di terapia "tradizionale", si inserisce l'utilizzo di "nuovi farmaci" quali l'*Etravirina*, l'*Enfuvirtide*, il *Raltegravir* e il *Maraviroc*, tenendo sempre ben presente che la loro efficacia risulta elevata solo se accompagnati dall'uso di uno o meglio due "compagni di viaggio" attivi nei confronti del virus.

## 1.11 HIV reservoir

Diversi studi hanno dimostrato che una sottopopolazione di cellule CD4<sup>+</sup> quiescenti isolate da individui HIV positivi sottoposti a regime di HAART contenevano HIV DNA integrato nel loro genoma (Chun et al., 1997) e che, in seguito a stimolazione, tali cellule erano in grado di produrre virioni infettanti (Finzi et

al.,1997). In seguito a tali evidenze si è presto giunti alla conclusione che il virus dell'immunodeficienza acquisita può persistere sotto forma di provirus integrato in particolari distretti sia tissutali che cellulari, definiti *reservoirs*, che fungono da veri e propri serbatoi dai quali il virus è in grado, in seguito a riattivazione, di replicarsi e che rappresentano il maggiore ostacolo all'eradicazione dell'infezione (D'Ettore *et al.*, 2010; Alexaki *et al.*, 2008). Il reservoir virale si formerebbe per lo più nel corso dell'infezione acuta, e verrebbe rifornito nella fase latente e in terapia dalla replicazione virale residua che infetta le nuove cellule T CD4<sup>+</sup> prodotte o, più probabilmente, dalla replicazione delle stesse cellule ospiti (Chomont *et al.*, 2009).

Quindi, in corso di infezione da HIV-1, si creano due compartimenti virologici distinti, ma comunicanti: un compartimento attivo, costituito dal virus libero nel sangue e da quello contenuto nei linfociti e monociti, dove il virus è attivamente replicativo ed è in grado di provocare un danno al sistema immunitario; ed un compartimento di latenza o reservoir.

Un reservoir virale è un determinato tipo cellulare o sito anatomico in cui un virus, competente da un punto di vista replicativo, persiste con proprietà cinetiche più stabili rispetto al pool cellulare principale, in cui esso replica attivamente. Il virus del reservoirs, protetto sia dall'intervento immunologico che farmacologico, è silente dal punto di vista trascrizionale e stabilmente integrato (Blankson *et al.*, 2002).

Questi compartimenti di riserva, che si formano fin dalle primissime fasi dell'infezione; essi sono rappresentati da alcuni organi, quali organi linfoidei, cervello, gonadi (dove ci sono barriere anatomiche che impediscono la libera circolazione delle cellule e dei farmaci, permettendo così la creazione di condizioni particolarmente favorevoli per la persistenza del virus), e da alcuni compartimenti cellulari:

le cellule follicolari dendritiche dei linfonodi (FDC), che sono in grado di trattenere sulla loro superficie esterna particelle virali che si possono mantenere infettive per lungo tempo. Esse pare abbiano un ruolo importante, soprattutto nelle prime fasi dell'infezione, per la loro funzione di presentazione dell'antigene che permette di portare il virus a contatto con gli organi linfoidei o i linfociti CD4<sup>+</sup>. Queste cellule hanno una emivita di circa due settimane, quindi abbastanza breve;

i monociti/macrofagi (Muller *et al.*, 2002) infettati, che non vengono uccisi dal virus, il quale può pertanto continuare a replicarsi. L'emivita dei macrofagi in soggetti non infetti è circa 15 giorni. Il differenziamento dei monociti a livello del midollo osseo richiede circa due settimane, poi essi vengono liberati nel torrente circolatorio che lasciano definitivamente due giorni dopo per differenziarsi in macrofagi tissutali. I monociti/macrofagi sono un compartimento in cui si instaura sia un'infezione cronica che un'infezione produttiva da parte di HIV, in assenza di effetto citopatico caratteristico invece delle cellule T attivate. La continua produzione virale e la capacità dei monociti di veicolare il virus in quasi tutto l'organismo rendono tale compartimento il più importante nel mantenimento dell'infezione. E' noto inoltre che i monociti/macrofagi costituiscono la principale fonte di virus in caso di interruzione o fallimento della terapia antiretrovirale. Il ruolo dei monociti è ancora controverso; sebbene sia possibile quantificare in essi il DNA di HIV-1 è difficile stimare la produzione virale da parte di queste cellule, in cui sono presenti barriere molecolari all'integrazione e alla trascrizione virale. Va dunque sottolineato

come la natura stessa della popolazione monocitaria circolante non permette di definire i monociti come *reservoir* virale “a lungo termine” (Davey *et al.*, 1999).

I linfociti T CD4<sup>+</sup> di memoria, che costituiscono uno dei maggiori ostacoli all'eradicazione dell'infezione da HIV (Chun *et al.*, 2005): essi sono considerati per numerosi motivi il maggior contributo all'instaurazione e al mantenimento dei reservoir virali. E' noto da tempo che i linfociti T CD4<sup>+</sup> sono le cellule maggiormente infettate nel corso di infezione da HIV (Zhang *et al.*, 2004) e che nel corso dell'infezione acuta, quando si formano i reservoir virali, i linfociti T CD4<sup>+</sup> quiescenti sono la tipologia cellulare maggiormente colpita dal virus (Li *et al.*, 2000). Esistono due diverse popolazioni di cellule CD4<sup>+</sup> quiescenti: le cellule CD4<sup>+</sup> naive e le cellule CD4<sup>+</sup> della memoria. Sebbene l'infezione di entrambi questi sottotipi cellulari sia tipica dell'infezione da HIV (Ostrowski *et al.*, 1999), i linfociti T della memoria rappresentano il serbatoio ideale per il mantenimento a lungo termine del genoma virale. I linfociti CD4<sup>+</sup> di memoria hanno una vita molto lunga, dato che la loro funzione biologica è proprio quella di garantire all'organismo una protezione immunitaria nei confronti di antigeni incontrati in precedenza; da notare come non tutte le cellule infette sviluppino un'infezione latente, ma è stato stimato che nei CD4<sup>+</sup> quiescenti il rapporto sia di circa una cellula su un milione (D'Ettorre *et al.*, 2010), e che numero totale di cellule con infezione latente nell'organismo sia prossimo a un milione (Chun *et al.*, 1997).

Calcolando l'emivita del DNA virale, ovvero delle cellule infette, risulta compresa tra 44-47 mesi, il che si tradurrebbe nella completa eradicazione del virus dall'organismo in 73,4 anni di terapia antiretrovirale (Watanabe *et al.*, 2011). Inoltre, poiché tali cellule sono quiescenti e non subiscono divisioni cellulari né vanno incontro a processi di attivazione o proliferazione in mancanza di appropriati stimoli ma bensì mantengono attivi solamente i processi cellulari basali necessari alla loro sopravvivenza, il loro apparato trascrizionale è tale da creare le condizioni per favorire la latenza virale con una capacità minima di supportare la trascrizione del genoma virale. Ciononostante, all'interno delle cellule può comunque avere luogo una produzione virale limitata ma sufficiente a “riseminare” il pool di cellule infettate produttivamente (Alexaki *et al.*, 2008): sebbene infatti la presenza del provirus all'interno delle cellule T CD4<sup>+</sup> quiescenti sia tipicamente associato alla latenza, esistono comunque prove che alcune di queste cellule siano in grado di produrre attivamente il virus, specialmente in pazienti con viremia rilevabile (Chun *et al.*, 2003).

Ora, come anticipato, il DNA virale è presente nel nucleo cellulare in diverse forme: provirale lineare integrato, lineare non integrato, episomiale circolare non integrato (D'Ettorre *et al.*, 2010).

Se il DNA provirale può essere trascritto e replicato quando la cellula ospite si replica, al pari di un gene cellulare, il DNA non integrato non viene replicato e viene progressivamente perso durante i cicli replicativi, ma può ancora essere trascritto e svolgere un importante quanto poco chiaro effetto patogenetico (Chun *et al.*, 1997). Il provirus in effetti, al pari di un gene cellulare, è totalmente immune dagli effetti della terapia antiretrovirale, e questa è la ragione per la quale l'attuale terapia non è in grado di colpire le cellule con infezione latente, per quanto il raltegravir e altri farmaci inibitori dell'integrasi

impediscono l'integrazione del DNA virale nel genoma umano, riducendo la replicazione virale e potenziando la risposta terapeutica in terapia combinata antiretrovirale (Steigbigel et al, 2008).

## **1.12 Monitoraggio di HIV-DNA nella pratica clinica**

Nella gestione clinica dell'infezione HIV-1, sono necessari frequenti controlli virologici e immunologici allo scopo di individuare rapidamente eventuali segnali precoci di fallimento della terapia e di seguire attentamente l'evoluzione e l'eventuale insorgenza di varianti virali resistenti (Mellors et al., 2007). In questo contesto, lo studio della carica di DNA virale potrebbe rivelarsi un marcatore importante. Finora, la conta dei linfociti CD4<sup>+</sup> e la carica plasmatica dell'RNA virale si sono dimostrati markers efficienti nella pratica clinica per il controllo e il monitoraggio del paziente HIVpositivo (Paolucci et al., 2001). Tuttavia, i livelli di carica virale possono variare a causa di diversi fattori legati sia al virus che all'ospite, come la fitness virale e l'immunoattivazione. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che non solo la replicazione virale non viene completamente abolita dalla terapia antiretrovirale (Kulkosky et al., 2006; Zanchetta et al., 2006), ma che il virus continua ad evolvere con la possibilità di sviluppare ceppi resistenti di quasispecie virali all'interno di sottopopolazioni cellulari che albergano l'infezione (Noë et al., 2005).

L'idea che HIV-1 DNA totale nei PBMCs possa avere una certa rilevanza clinica deriva da due piccoli studi del 1994 (Verhofstede et al., 1994; Chevret et al., 1994). In seguito, numerosi studi hanno evidenziato come la quantificazione dell'HIV-DNA totale possa essere utilizzata nella fase pre-terapeutica come marcatore prognostico di fallimento virologico e immunologico, e, nel corso del follow-up, come indicatore di progressione di malattia (Parisi et al., 2012). Infine, come l'HIV-DNA possa essere utilizzato per decidere quando iniziare la terapia antiretrovirale (D'Ettorre et al, 2010).

Oggi è possibile valutare l'evoluzione e la dinamica dell'infezione da HIV attraverso la misurazione della carica di HIV-DNA come marcatore in grado di fornire informazioni sulla quantità di virus presente a livello dei tessuti del sistema immunitario dell'ospite (D'Ettorre et al., 2010). In particolare: la carica di HIV-DNA può fornire una stima del numero di cellule infettate (inclusi i linfociti CD4<sup>+</sup>) e sulle dimensioni del serbatoio virale dal quale particelle virali infette potrebbero eventualmente essere prodotte e rilasciate (Re et al, 2006)), fornendo così un'idea sull'ampiezza dell'infezione.

### **1.12.1 Le varie forme di HIV-DNA**

Nelle cellule infettate, il DNA si può trovare in diverse forme: lineare integrato, lineare e come forma circolare non integrata.

Dopo l'entrata del virus nella cellula ospite, l'enzima RT converte il genoma virale da RNA in un doppio filamento di DNA (dsDNA) (Gomez and Hope, 2005). Attraverso il complesso di pre-integrazione (PIC), il DNA neofornato entra nel nucleo ma non tutto si integra nel genoma dell'ospite (Pauza et al, 1994). In base allo stato delle cellule T CD4<sup>+</sup> infette, il provirus può andare incontro a due diversi *pathways*; può essere attivamente trascritto o potrebbe rimanere in uno stato di latenza (Robinson and Zinkus, 1990). Il

provirus stabilmente integrato e trascrizionalmente silente, non è influenzato dalla terapia antiretrovirale. Le altre forme di HIV DNA possono essere considerate come prodotti secondari e sono rappresentate dalle forme lineari e circolari non integrate, che vengono distinte in 1-LTR o 2-LTR in base alla presenza di una o due sequenze long terminal repeat (LTR). Si pensa che una grande quantità di DNA non integrata nel nucleo delle cellule infette sia il risultato di infezioni multiple (Teo et al, 1997). Sia nelle cellule T CD4<sup>+</sup> attive che in quelle *resting*, l'HIV DNA non integrato rappresenta la maggior parte di DNA e una grande quantità di esso può essere rilevato *in vivo*. Inoltre la maggior parte dell'HIV DNA sembra trovarsi nella forma non integrata soprattutto in quei pazienti con viremia rilevabile nel plasma (Butler et al, 2001). Sebbene queste forme di DNA siano intermedi labili, la loro rilevazione potrebbe essere un'indicazione di un'infezione produttiva. Sharkey et al., suggeriscono che i 2-LTR potrebbero essere usati come marker prognostico di infezione recente, oppure replicazione in atto in quei pazienti trattati con HAART che presentano una viremia undetectable.

Il loro ruolo nella patogenesi di HIV rimane tuttora non chiaro, tuttavia Wu et al, suggeriscono che potrebbero giocare un ruolo importante nel generare un'infezione produttiva (Wu et al, 2004).

### **1.12.2 Ruolo dell'HIV-DNA nel monitoraggio delle strategie terapeutiche**

La quantificazione e l'analisi della carica di HIV-DNA possono fornire ulteriori informazioni sullo stato dell'infezione da HIV e sui benefici di un inizio precoce della terapia antiretrovirale: è stato infatti dimostrato che una bassa conta di linfociti CD4<sup>+</sup> associata ad una elevata carica di HIV-DNA nel corso dell'infezione primaria portano ad una rapida progressione verso l'AIDS e ad un aumento nel tasso di mortalità (Goujard et al., 2006). I vantaggi ottenuti dalla misurazione della carica di HIV-DNA si sono dimostrati utili anche nel corso del monitoraggio dell'infezione cronica: infatti, è stato dimostrato che anche in pazienti cronici che cominciavano la terapia, coloro i quali presentavano una conta di linfociti CD4<sup>+</sup> < 350 cellule/ $\mu$ l e una carica di HIV-DNA < 3log<sub>10</sub> copie/10<sup>6</sup> PBMCs presentavano un rischio minore di progressione clinica verso l'AIDS di pazienti con una conta linfocitaria > 350 cellule/ $\mu$ l e carica di HIV-DNA > 3log<sub>10</sub>/10<sup>6</sup> PBMCs (Kostrikis et al., 2002). Tuttavia la definizione di un valore soglia utile a discriminare i pazienti più a rischio di progressione o di fallimento virologico è ancora controversa. Difatti nello studio di Rouzioux et al., viene proposto il valore di 3 log<sub>10</sub> copie/10<sup>6</sup> PBMCs come discriminante tra i pazienti a maggior e minor rischio, mentre nello studio di Goujard et al., il valore che distingue i due strati di dati relativi all'HIV-DNA è 3,2 log<sub>10</sub> copie/10<sup>6</sup> PBMCs, ed infine nello studio di Masquelier et al. il medesimo valore soglia tra i due strati è 3,7 log<sub>10</sub> copie/10<sup>6</sup> PBMCs .

Ne consegue che una valutazione estesa alla conta delle cellule TCD4<sup>+</sup>, l'HIV RNA e l'HIV DNA che anche in presenza di un'alta conta linfocitaria il valore di DNA virale rappresenta un fattore di rischio di progressione della malattia.

Il ruolo di HIV-DNA come marcatore clinico è stato dimostrato anche da studi riguardanti il rischio di sviluppare patologie correlate all'infezione da HIV: due studi principali (Langford *et al.*, 2006; Shiramitsu *et al.*, 2007) hanno evidenziato come, in condizioni di viremia plasmatica non rilevabile,

esista il rischio per il paziente HIV positivo di sviluppare disordini neurocognitivi legati all'infezione ed è stato successivamente dimostrato che esiste una correlazione positiva tra la quantità di HIV-DNA presente nelle cellule mononucleate del sangue periferico e l'insorgenza di disturbi neurocognitivi (Shiramitsu *et al.*, 2009). Sebbene il ruolo della carica di HIV-DNA virale sia tutt'ora oggetto di studi circa l'importanza che questo valore possa assumere nel monitoraggio dell'infezione da HIV, è stato ormai dimostrato come:

- HIV-DNA sia un efficace marcatore nel predire la progressione della malattia più efficacemente di valori quali la viremia plasmatica e la conta linfocitaria (Rouizoux *et al.*, 2005) e sia possibile correlare i livelli di HIV-DNA nei PBMCs con l'efficacia della terapia antiretrovirale (McDermott *et al.*, 1999);
- I livelli di HIV-DNA possono essere usati come valori predittivi di *rebound* virali dopo interruzione del trattamento (Yerly *et al.*, 2004) e alti livelli di HIV-DNA misurati al momento dell'interruzione del trattamento siano predittivi di un tempo più breve di sospensione della terapia farmacologica, laddove altri fattori quali i livelli di HIV RNA plasmatici pre-ART (Tebas *et al.*, 2002), il nadir dei CD4<sup>+</sup> e la precedente durata della terapia antiretrovirale non si sono dimostrati marcatori efficaci (Maggiolo *et al.*, 2004);
- Lo studio del HIV-DNA associato ai PBMCs è un interessante marcatore anche nel fornire informazioni riguardanti lo stato virologico e immunologico del paziente prima dell'inizio della terapia in quanto i suoi livelli correlano con lo *zenith* viremico ed hanno una relazione inversa con il nadir della conta delle cellule CD4<sup>+</sup> (Burgard *et al.*, 2009), suggerendo che la l'ampiezza del *reservoir* possa dipendere dall'intensità della replicazione virale al momento dell'infezione (prima della HAART) e aggiunge ulteriore credito all'ipotesi che un inizio precoce della terapia antiretrovirale possa avere effetti benefici anche sull'instaurarsi dei *reservoirs* (Ngo-Giang-Huong *et al.*, 2001);
- HIV-DNA è un predittore di successo a lungo termine in terapie semplificate che risparmiano l'uso di inibitori delle proteasi, tanto che pazienti sottoposti a queste terapie con livelli di HIV-DNA maggiori di 226 copie/10<sup>6</sup> PBMCs si sono dimostrati essere più pronti a blips e fallimenti virologici (Sarmati *et al.*, 2007).

## 1.13 Tropismo

### 1.13.1 Il gene *env*

Il gene *Env* di HIV-1 codifica per l'unica proteina espressa dal virus in superficie, ovvero una glicoproteina di 160 kD che, dopo essere stata tradotta, viene processata dando origine ai peptidi gp120 e gp41, che rimangono associati non-covalentemente per formare una singola subunità del trimero esposto sul virione. La porzione C-terminale del trimero è rappresentata dalla gp41, la quale presenta un dominio extracellulare necessario alla fusione fra membrana plasmatica e virale. La subunità N-terminale (gp120) ha una struttura più complessa ed è organizzata in cinque regioni conservate (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) intersperse in regioni variabili, V<sub>1</sub>-V<sub>5</sub> (Fig.1.11). Alcuni residui amminoacidi nelle regioni costanti e nella porzione variabile V<sub>4</sub> interagiscono con il recettore CD4 espresso dalle cellule bersaglio del virus, mentre il V<sub>3</sub> loop è coinvolto



nel legame con il corecettore. Due fondamentali caratteristiche della superficie esposta del trimero, ovvero la gp120, influenzano fortemente le interazioni con la cellula: la sua variabilità nella sequenza proteica e i siti di glicosilazione che, legando carboidrati, ne mascherano la superficie.

La sequenza codificante della gp120 muta più facilmente (1-2% ogni anno) rispetto a ogni altra regione del genoma di HIV (Leitner et al, 1997). Tuttavia, tali variazioni sono concentrate in regioni geniche discrete, in modo da proteggere la struttura e la funzionalità proteica. La variabilità è influenzata principalmente dalla pressione selettiva esercitata dal sistema immunitario dell'ospite, ma alcune mutazioni nella sequenza possono anche alterare i meccanismi di interazione con recettori e corecettori cellulari. La pressione selettiva su Env da parte del sistema immunitario è dovuta soprattutto all'azione di anticorpi neutralizzanti.

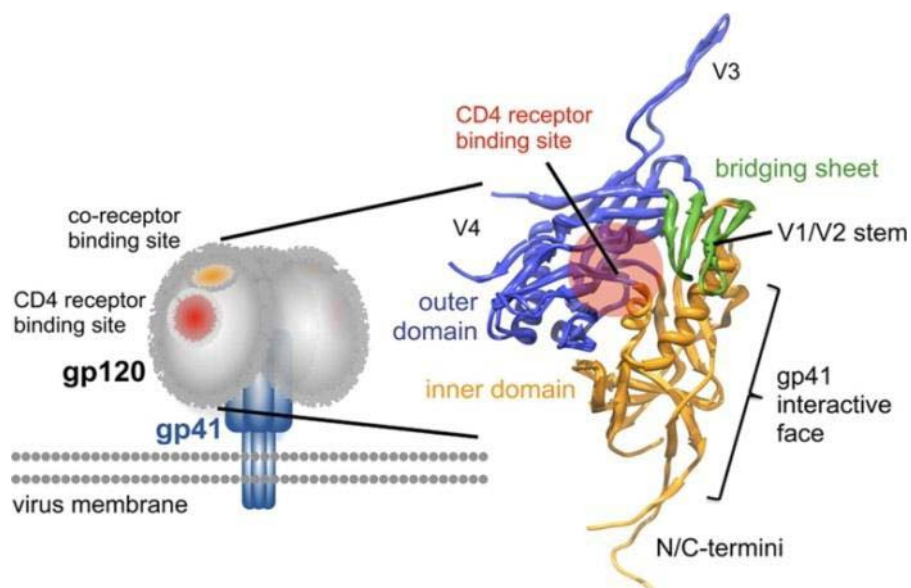


Figura 1.11 Struttura di gp120 (Guttman et al, 2012)

La risposta dell'ospite guida, infatti, guida la selezione di varianti alternative "escape", ovvero invisibili al sistema immunitario. Bersagli fondamentali di tali anticorpi sono le regioni variabili V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>4</sub> e V<sub>5</sub>, ma poiché le mutazioni vengono introdotte random, l'alto tasso di variabilità di questi loop non è dovuta tanto a una maggiore propensione a mutare, quanto piuttosto al fatto che le mutazioni in tali regioni non compromettono la funzionalità delle proteine "escape" codificate.

In aggiunta alla sua variabilità, il tasso di glicosilazione di Env rappresenta un ulteriore fondamentale meccanismo di evasione della risposta anticorpale; la presenza di specifiche triplette amminoacidiche (N-X-S/T) nelle regioni variabili, infatti, ha il duplice effetto di aumentare la probabilità di duplicazioni e delezioni ma anche di codificare per siti di glicosilazione che "nascondono" la proteina al controllo del sistema immunitario. La sequenza e la struttura di Env mediano, dunque, un equilibrio fondamentale tra l'ingresso del virus nella cellula ospite e l'evasione dalla neutralizzazione anticorpale.

### 1.13.2 Ruolo dei corecettori nell'infezione da HIV-1

Alcuni anni prima dell'identificazione dei due corecettori coinvolti nell'entrata di HIV-1 nella cellula ospite, è stato dimostrato che le varianti del virus possono presentare differenti fenotipi *in vitro*. Nel 1987 Sakai et al. (Sakai et al, 1988) isolarono, da uno stesso paziente, cloni virali con diversa citopatogenesi e differente tropismo per cellule T e monociti. Due anni dopo, alcuni ricercatori svedesi mostrarono che le varianti del virus presenti in pazienti HIV-1 asintomatici replicavano molto lentamente nelle cellule immunitarie del sangue periferico ed erano incapaci di infettare linfociti T, mentre i virus isolati da pazienti con grave immunodeficienza replicavano rapidamente e con elevata efficienza nelle stesse linee cellulari (Fenyo et al, 1989). Vennero quindi identificati i fenotipi *T cell*-tropico (T-tropico) e *Monocito*-tropico (M-tropico), i quali presentavano diversi effetti patogenetici: l'infezione della linea cellulare linfoblastoide MT-2 con ceppi virali T-tropici si traduceva nella formazione di estesi sincizi (indicatori di una attiva replicazione di HIV-1), mentre l'infezione da parte dei virus M-tropici andava incontro a fallimento. Tali osservazioni furono dunque determinanti per definire fenotipicamente i ceppi T-tropici come « syncitium-inducing » (SI), mentre le varianti M-tropiche vennero identificate come « nonsyncitium-inducing » (NSI). Sebbene i pazienti asintomatici albergassero prevalentemente virus NSI, nel 50% dei casi si osservava uno « switch » verso ceppi T-tropici, che si associava inevitabilmente a una progressione della malattia (Fenyo et al, 1994; Karlsson et al, 1994). Per tali ragioni, verificare la capacità degli isolati virali di replicare in cellule MT2 sembrava un metodo estremamente efficace per distinguere le due varianti del virus, al punto che questo test venne introdotto come saggio prognostico per definire lo stadio dell'infezione; tuttavia, con l'introduzione nella pratica diagnostica del monitoraggio della carica virale, molti laboratori persero l'interesse per il saggio MT2 ai fini prognostici. A metà degli anni '80, il CD4 fu il primo recettore identificato quale strumento chiave per l'ingresso di HIV nella cellula, ma fu subito chiaro che il legame al solo recettore CD4 non era sufficiente all'infezione (Berger, 1997). Più di dieci anni dopo, nel 1996, venne identificato il corecettore CCR5 quale molecola coinvolta nell'interazione con la gp120 (Alkhatib et al, 1996). Poco tempo dopo fu scoperto l'altro corecettore, oggi noto come CXCR4, utilizzato dal virus nella fase di ingresso (Oberlin et al, 1996).. La scoperta dei corecettori fornì la spiegazione molecolare alla base dell'esistenza dei due fenotipi virali. Dal momento che le MT2 esprimevano esclusivamente il CXCR4, i virus T-tropici, fenotipicamente *syncitium-inducing* e MT2(+), erano dunque in grado di sfruttare questa molecola, mentre i virus M-tropici (NSI e MT2(-)) legavano esclusivamente il CCR5. Negli anni successivi, vennero individuati, oltre ai ceppi R5 e X4-tropici, i virus dual/mixed(DM)-tropici (R5X4), ovvero in grado di utilizzare entrambi i corecettori (Fig.1.12) e che caratterizzavano la fase di switch corecettoriale. In seguito alla scoperta dei corecettori, fu osservata un'associazione tra il tropismo e la sequenza amminoacidica della V<sub>3</sub> (Fouchier et al, 1992), porzione proteica della gp120. Tale osservazione spinse la ricerca verso la formulazione di un farmaco in grado di legare i corecettori e impedirne il legame con la glicoproteina virale. Con l'approvazione dell'inibitore del CCR5 Maraviroc per l'uso clinico, si rese necessaria l'introduzione,

nella routine diagnostica, di test genotipici e fenotipici in grado di predire il tropismo e, di conseguenza, la suscettibilità virale al farmaco.

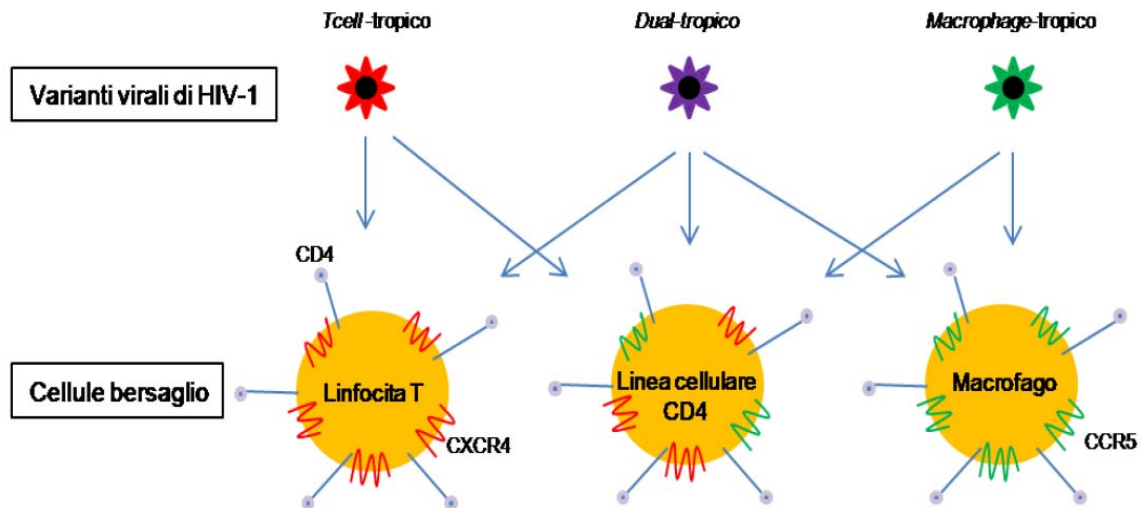


Figura 1.12 Fenotipi di HIV-1

Inoltre, la capacità del Maraviroc di inibire esclusivamente la replicazione di ceppi R5-tropici ha aumentato la necessità e l'interesse per lo studio dei corecettori nella patogenesi.

### 1.13.3 Corecettori e tropismo

Come descritto, la proteina Env è la molecola deputata a interagire con il CD4 e a subire una serie di cambiamenti conformazionali che consentono la fusione delle membrane con rilascio del *core* virale nel citoplasma della cellula. Dal momento che la maggior parte degli eventi di trasmissione del virus avvengono attraverso le superfici mucosali, che la replicazione attiva di HIV ha luogo nei tessuti linfoidi e che le manifestazioni cliniche della malattia si osservano in molteplici organi e tessuti, è deducibile che il virus abbia l'opportunità di venire a contatto con differenti tipi cellulari. Pertanto, gran parte della ricerca sulla patogenesi di HIV-1 è centrata su Env e sul suo ruolo nell'ingresso del virione. È dunque necessario, ancora oggi, caratterizzare le diverse varianti in grado di infettare linee cellulari distinte, capirne la prevalenza nel corso dell'infezione e il ruolo chiave nella malattia.

Per 25 anni la teoria della comunità scientifica si è fondata sulla presenza di due fenotipi virali, legati alla capacità degli isolati di crescere in linee di linfociti T e di indurre la formazione di sincizi. La dicotomica classificazione, universalmente accettata, in virus *syncitium-inducing*/X4/linfocito-tropici e virus *non-syncitium-inducing*/R5/macrofago-tropici non palesava però il fatto che soltanto una piccola ma importante proporzione di virus R5 era in grado di infettare i macrofagi; si rese dunque necessaria una ulteriore distinzione fra ceppi CCR5 con tropismo per linfociti T e macrofagi.

### **1.13.3.1 Virus R5 linfocito-tropici (*T cell-tropic*)**

I linfociti T CD4<sup>+</sup> attivati sono la principale fonte di replicazione di HIV-1 (Douek et al, 2002). Le cellule T vengono attivate nell'ambito della risposta immune e il loro rapido metabolismo rende la replicazione virale più efficiente. Queste cellule sono generalmente infettate dal ceppo virale che viene trasmesso, che persiste nell'ospite per anni e che molto spesso causa immunodeficienza. Il fenotipo di questi virus è CCR5 e l'ingresso nella cellula target è garantito da elevati livelli di espressione di CD4 nel linfocita.

### **1.13.3.2 Virus R5 macrofago-tropici (*M-tropic*)**

Alcuni isolati virali che replicano nei linfociti T CD4<sup>+</sup> possono infettare anche i macrofagi. Un clone virale comunemente utilizzato in laboratorio, Ba-L, è stato il primo isolato M-tropico. I virus M-tropici sono stati spesso isolati nel cervello di pazienti HIV con disordini neurocognitivi, così come nel liquido cerebrospinale; in questi siti, i virus M-tropici giocano un ruolo diretto nella patogenesi (Dunfee et al, 2007). Nel cervello, i ceppi M-tropici replicano nei macrofagi perivascolari o nella microglia, cellule simili ai macrofagi presenti nel parenchima cerebrale. Diversamente, i linfociti T sono pressoché assenti nel sistema nervoso centrale, ma in caso di infiammazione possono essere richiamati ad attraversare la membrana emato-encefalica e diventano fonte di attiva replicazione per i ceppi R5.

Le varianti M-tropiche sono state isolate da autopsie di tessuto cerebrale o dal liquor; nelle fasi avanzate dell'infezione, esse possono essere rilevate come varianti minori nel sangue (Li et al, 1999), nonostante la loro origine anatomica non sia stata ancora definita. Sebbene l'infezione dei macrofagi richieda al virus diversi step adattativi, i ceppi virali M-tropici sono in grado di infettare cellule con bassi livelli di CD4, che normalmente viene meno espresso nei macrofagi rispetto ai linfociti T attivati. Alcuni studi hanno evidenziato, quindi, delle variazioni di sequenza di Env nel sito attivo di legame con il CD4, nelle regioni fiancheggianti V<sub>3</sub> ma anche in V<sub>1</sub>-V<sub>2</sub> e gp41, che permetterebbero a queste varianti di legare con alta affinità il CD4 laddove questo venga espresso a bassi livelli; tuttavia, i determinanti genetici per il tropismo macrofagico non sono ancora stati chiaramente definiti.

### **1.13.3.4 Virus X4 *T-cell tropic***

L'evoluzione delle varianti che possono utilizzare il corecettore CXCR4 è un aspetto ancora dibattuto. In particolare, è ancora poco chiaro se queste varianti vengano selezionate al momento della trasmissione, se possano replicare attivamente solo in un ospite con immunodeficienza e se rappresentino la causa o la conseguenza della rapida progressione della malattia. Inoltre, è stato dimostrato in alcuni casi che i differenti sottotipi possono avere una diversa propensione all'evoluzione delle varianti X4. Storicamente, i virus X4 erano concepiti come varianti più patogeniche degli R5 e che comparivano tardivamente nel corso della malattia. Questa idea era principalmente legata alla loro capacità di indurre la formazione di sincizi. Tuttavia, tale affermazione fu parzialmente smentita dall'osservazione che alcuni ceppi R5-tropici (considerati normalmente *non syncytium-inducing*) possono crescere in linee di linfociti T immortalizzati e possono causare la formazione di sincizi se il CCR5 è espresso. Dunque esistono ancora almeno due principali aspetti ancora poco chiari riguardanti i virus X4. Innanzitutto occorre definire, come già

accennato, se i virus X4 possano causare una più rapida progressione della malattia o siano un marcatore dell'aumentata compromissione del sistema immunitario. In secondo luogo, se i virus *dual*-tropici continuino a usare anche il CCR5 *in vivo* o se soltanto il CXCR4 sia biologicamente rilevante. La maggior parte degli isolati X4 sono *dual*-tropici, dunque questo aspetto è fondamentale per una miglior comprensione del loro ruolo nel paziente. Una ulteriore osservazione dalle cause ancora poco chiare riguarda il fatto che gli X4 sono prevalenti nei soggetti trattati che hanno fallito la terapia antiretrovirale (ART). Ancor prima dell'identificazione dei corecettori di HIV-1, era noto che i cambiamenti nella sequenza del V<sub>3</sub> *loop* definivano le caratteristiche fenotipiche dei virus X4-tropici, prevalenti negli stadi tardivi dell'infezione. La maggior osservazione del cambiamento fenotipico da R5 a X4 è la comparsa di amminoacidi basici (carichi positivamente) nelle posizioni 11, 24 e 25 di V<sub>3</sub> (Milich et al, 1997). D'altra parte, la variabilità complessiva di questa regione è maggiore qualora siano presenti le mutazioni nei suddetti residui, suggerendo che esse siano il risultato di un processo evolutivo più articolato. L'introduzione di amminoacidi carichi positivamente e l'aumentata diversità di V<sub>3</sub> nei ceppi X4, ha reso possibile lo sviluppo di strumenti bioinformatici in grado di predire il tropismo sulla base della sequenza primaria di V<sub>3</sub>. Tuttavia, lo switch da tropismo R5 a X4 è dovuto a cambiamenti di sequenza anche all'esterno di V<sub>3</sub>. Virus ricombinanti ottenuti in laboratorio hanno dimostrato il coinvolgimento di altre regioni di Env (Huang et al, 2008), sebbene l'interpretazione dei risultati ottenuti sia complicata da diversi fattori. In particolare, la capacità di entrare nelle cellule utilizzando il CXCR4 può essere molto variabile, soprattutto nei ceppi virali in grado di usare entrambi i corecettori; pertanto, la rilevanza biologica *in vivo* dell'uso di CCR5 e/o CXCR4 nei ceppi *dual*-tropici deve ancora essere definita.

#### **1.13.4 Tropismo e compartimentalizzazione**

*In vivo*, HIV-1 è in grado di infettare numerosi tipi cellulari, purché essi esprimano il CD4 e uno dei noti corecettori maggiormente usati dal virus. Il CCR5 è espresso nei linfociti T *memory*, nei linfociti T CD4<sup>+</sup> attivati ma anche in macrofagi, cellule dendritiche e microgliali. La frequenza delle cellule T *memory* CCR5<sup>+</sup> è relativamente alta nei tessuti linfoidei associati all'intestino (*gut-associated lymphoid tissues*, GALT). L'espressione di CXCR4, invece, è preponderante nei linfociti T naive e si riduce a seguito del loro differenziamento e attivazione. CXCR4 è anche espresso nei linfociti T CD8<sup>+</sup>, nelle cellule B, nei neutrofili e negli eosinofili. Considerata la diversa espressione dei corecettori nei sottogruppi di cellule T, la replicazione residua di virus R5 e X4-tropici potrebbe avere differente impatto sull'omeostasi dei linfociti T durante la ricostituzione del sistema immunitario.

##### **1.13.4.1 Cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs)**

Nei Paesi industrializzati, la maggior parte dei pazienti trattati con ART ha una carica virale irrilevabile nel plasma e le strategie di gestione degli effetti collaterali della terapia prevedono spesso l'introduzione degli antagonisti del CCR5. Al fine di caratterizzare il tropismo nel DNA provirale, sono stati quindi condotti alcuni studi che hanno dimostrato come la proporzione di ceppi R5 nel DNA possa variare dal 48% nei pazienti pluritrattati al 92% nei pazienti naive (non sottoposti a trattamento farmacologico) con

infezione primaria (Frange et al, 2009; Verhofstede et al, 2011). Questa proporzione è simile a quella stimata nel plasma e, considerato che nei pazienti naïve il tasso di discordanza del tropismo tra RNA plasmatico e DNA è del 4.8-10%, si può concludere che vi è notevole corrispondenza nell'uso del corecettore fra i due compartimenti. Alcuni studi, inoltre, hanno osservato che nei pazienti trattati con ART e con carica virale irrilevabile per lungo tempo, c'è un'evoluzione delle quasi-specie virali nel DNA verso tropismo CXCR4.

Differenti meccanismi possono guidare l'evoluzione del tropismo nei reservoirs durante la ART e lo switch R5-X4 del DNA nei "serbatoi" dell'ospite è un vivo argomento di discussione. Il ripristino del sistema immunitario in risposta alla ART dipende dall'incremento dei linfociti T naive. Queste cellule potrebbero rappresentare un reservoir importante nei pazienti infetti con ceppi X4, dal momento che possono esserne facilmente infettate. Il virus presente nei reservoirs può comunque replicare a bassi livelli o essere rilasciato sporadicamente; si ipotizza che l'uno, l'altro o entrambi i fenomeni siano all'origine della "viremia residua". I linfociti T naive contribuirebbero a tale fenomeno mediante due meccanismi: da una parte, l'espansione delle cellule T e il rilascio del virus dagli archivi di ceppi X4 potrebbe portare a una progressiva sostituzione del reservoir T *memory*; dall'altra, la replicazione residua dei pazienti sottoposti ad HAART potrebbe consentire l'evoluzione genetica delle quasispecie e il cambio dell'uso del corecettore

### **1.13.4.2 Monociti**

Diversi studi hanno dimostrato chiaramente la capacità del virus di infettare i macrofagi *in vivo*, che rappresentano uno dei principali compartimenti di "riserva" delle varianti virali. Tali evidenze hanno focalizzato l'attenzione sul ruolo dei precursori dei macrofagi, ovvero i monociti, nell'infezione da HIV. I monociti possono essere distinti in tre classi: monociti "classici", esprimenti alti livelli di CD14 e privi di CD16 (CD14<sup>++</sup>,CD16<sup>-</sup>), monociti "intermedi" con alti livelli di CD14 e ridotta espressione di CD16 (CD14<sup>++</sup>,CD16<sup>+</sup>) e monociti "non-classici" con bassi livelli di CD14 ed elevata espressione di CD16 (CD14<sup>+</sup>,CD16<sup>++</sup>). Nei donatori sani, circa l'85% dei monociti è rappresentato dai "classici" (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup>). Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che i linfociti isolati da sangue periferico non vengono infettati produttivamente da HIV-1 ma l'infezione avviene dopo il loro differenziamento in macrofagi, circa 24 ore in seguito all'isolamento (Naif et al, 1998). La resistenza dei monociti all'infezione da HIV-1 è dovuta verosimilmente al blocco di diverse fasi del ciclo replicativo virale. Un blocco dell'entrata si potrebbe verificare se la densità del CD4 o di CCR5/CXCR4 fosse molto bassa nei monociti; tuttavia, in queste cellule, il CD4 è espresso a livelli apprezzabili mentre i corecettori sono espressi solo da alcune sottopopolazioni monocitarie e a bassi livelli, che impedirebbero un'infezione produttiva. Un modello alternativo si basa su una teoria secondo la quale l'infezione da HIV-1 nei monociti non è bloccata, in quanto il meccanismo descritto sopra contribuisce soltanto a rallentare il ciclo replicativo del virus. Considerando che i monociti persistono nel sangue soltanto per pochi giorni prima di morire o migrare nei tessuti e differenziare in cellule dendritiche o macrofagi, potrebbe essere necessario il differenziamento per avere la produzione di virus da parte del monocita precedentemente infettato. A

conferma di tale teoria, diversi studi *in vivo* hanno dimostrato la presenza di HIV-DNA nei monociti isolati da sangue periferico (Zhu et al, 2002; Sonza et al, 2001). Data la scarsa capacità del virus di replicare efficacemente nei monociti, è improbabile che la replicazione in queste cellule contribuisca in modo sostanziale all'aumento della carica virale; tuttavia, considerata la loro capacità di entrare nei tessuti e permanervi a lungo, è plausibile che essi svolgano un ruolo determinante per la disseminazione del virus in siti anatomico-tissutali dove hanno origine popolazioni virali indipendenti.

Uno dei principali limiti di tali studi *in vitro* è rappresentato dal fatto che non vengono discriminate le tre diverse popolazioni di monociti. Dal momento che l'85% della popolazione monocitaria *in vivo* è rappresentato da monociti CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, la maggior parte degli esperimenti viene condotta su queste cellule. Tuttavia i CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> sono per lo più indifferenziati, esprimono i più bassi livelli di CCR5 e sono i meno suscettibili all'infezione *in vitro*. Diversamente, le popolazioni di monociti esperimenti CD16 sono invece più permissive all'infezione e dunque rappresenterebbero un miglior modello da utilizzare.

#### **1.13.4.3. Sistema nervoso centrale**

La maggior parte dei ceppi di HIV che infettano i macrofagi usano il corecettore CCR5. Per questo, i virus R5-tropici sono predominanti nei tessuti in cui monociti e macrofagi sono molto diffusi, ad esempio nel tessuto cerebrale. Come accennato nel paragrafo 1.13.4.2, i macrofagi rappresentano un importante serbatoio di infezione, teoria supportata dall'evidenza che gli isolati virali di pazienti con encefaliti e demenza da HIV sono R5-tropici. I virus rilevati nel liquido cerebrospinale hanno origine sia dal sistema nervoso centrale che da sangue periferico. Questo compartimento sarebbe quindi un importante sito di incontro e ricombinazione di virus provenienti dal sistema nervoso e circolatorio, talora con tropismo differente. Tale aspetto assume dunque decisiva importanza in caso di somministrazione di antagonisti del CCR5.

#### **1.13.4.4 Compartimento genitale**

Alcuni studi filogenetici hanno riportato che i compartimenti genitali costituiscono anch'essi dei serbatoi di infezione con ceppi virali diversi da quelli presenti nel sangue dei pazienti. Per quanto riguarda i virus presenti nel liquido seminale, non è stata evidenziata una specifica compartimentalizzazione del tropismo, dal momento che i virus presenti in questo sito possono avere indifferentemente tropismo X4 o R5. Analogamente, molti studi hanno riportato che nel tratto genitale femminile esiste una chiara divergenza genetica rispetto ai ceppi virali ematici, ma con una preponderante replicazione in questo sito di virus X4-tropici. Essi deriverebbero da virus in attiva replicazione nel sangue, ma sarebbero poi selezionati positivamente nelle secrezioni femminili. Nonostante tali evidenze, alcuni studi filogenetici sulla trasmissione di HIV hanno riportato che esiste un "collo di bottiglia" che selezionerebbe favorevolmente i ceppi R5, per cui queste varianti dovrebbero essere prevalenti nei compartimenti genitali. Dal momento che tali risultati sono stati confutati in altri lavori, tale aspetto rimane ancora da chiarire.

#### **1.13.4.5. Tessuto linfoide associato all'intestino (GALT)**

Il GALT è il tessuto linfoide più esteso del corpo umano ed è costituito da un'ampia popolazione cellulare CD4<sup>+</sup> esprimente CCR5. È stato riportato che HIV persiste in questo tessuto anche in presenza di una ART efficace. Un recente studio ha chiaramente dimostrato la mancanza di compartimentalizzazione delle quasispecie di HIV-1 tra circolazione ematica e GALT attraverso l'analisi delle sequenze C<sub>2</sub>-V<sub>3</sub>. Gli autori dello studio hanno concluso che la mucosa intestinale non rappresenta un sito "santuario" per la replicazione di HIV-1 ma si evidenzia un libero scambio di virus tra sangue ed epitelio intestinale.

#### **1.13.5 Tropismo e stadi di infezione**

Dal punto di vista della patogenesi, i virus R5 vengono rilevati nella maggior parte delle infezioni primarie, mentre i ceppi X4 emergono tardivamente. Di conseguenza il corecettore CCR5 sembra giocare un ruolo fondamentale nella trasmissione del virus e durante le prime fasi della malattia. Ulteriori dati a supporto di questa teoria derivano dall'identificazione di una mutazione nel gene codificante la molecola CCR5 (CCR5-Δ32) presente nel 10% della popolazione caucasica. L'omozigosità per questa mutazione è estremamente rara (1%) ma è associata alla totale mancanza di espressione della proteina e a resistenza all'infezione da HIV-1. L'eterozigosità della mutazione è invece associata a bassi livelli di espressione del CCR5 e a una ridotta progressione della malattia.

I primi studi sull'uso del corecettore nelle infezioni recenti (ovvero in cui il paziente era infetto da massimo sei mesi) si basavano sui risultati del saggio sulle MT2 e riportavano quasi esclusivamente la presenza di ceppi NSI, ossia R5-tropici. I successivi saggi fenotipici, basati sulla produzione di pseudovirus ricombinanti, rilevarono invece la presenza di ceppi X4 o dual-tropici in circa il 3% dei pazienti con infezione primaria. Diverse percentuali sono state riportate nel caso dei test genotipici, i quali stimano una proporzione di virus X4 in pazienti recentemente infettati pari a circa il 13%. Tuttavia, alcuni studi (Chalmet et al, 2012) hanno evidenziato che alcuni metodi di interpretazione della sequenza possono sovrastimare la proporzione di X4 rilevati, pertanto tali percentuali possono variare dal 5 al 20%.

La prevalenza nell'uso del corecettore è stata studiata ampiamente anche nei soggetti naive in procinto di iniziare la terapia. La percentuale di X4 osservata in questo gruppo si aggira intorno al 10% nei pazienti infetti da almeno 4 anni e con un relativamente alto numero di cellule CD4<sup>+</sup>, mentre nei pazienti in stadio avanzato con CD4 inferiore a 200 cell/μL o clinicamente sintomatici, la percentuale di X4 aumenta, oscillando tra il 38% e il 52% (Shepherd et al, 2008). È interessante sottolineare che fra i pazienti con malattia in fase avanzata, la proporzione di virus X4 supera raramente il 50% ; la metà restante è rappresentata da pazienti infettati con ceppi R5-tropici e quindi candidati all'utilizzo del Maraviroc.

Sulla base di quanto riportato in letteratura si sostiene generalmente che, nel corso dell'infezione, le varianti X4-tropiche si evolvono dai pre-esistenti virus R5. Studi longitudinali con metodiche di sequenziamento ad alta sensibilità (*ultra-deep sequencing*) hanno mostrato che la transizione R5/X4 segue un percorso « multistep », che consiste nell'accumulo di mutazioni in regioni coinvolte nel legame al corecettore (principalmente V<sub>3</sub>) e che ha come risultato il cambio di tropismo. Altri lavori hanno



dimostrato che le varianti X4 possono essere archiviate nel DNA cellulare già nelle prime fasi dell'infezione e che queste possano riemergere in seguito a pressione selettiva. I pazienti HIV positivi che sono andati incontro a switch del corecettore mostrano un accelerato aumento della carica virale, riduzione delle cellule T e una rapida progressione verso l'AIDS (Fig.1.13).

I meccanismi alla base dello switch sono ancora scarsamente conosciuti e non è del tutto chiaro se l'evoluzione verso il tropismo X4 sia causa o conseguenza della progressione della malattia. Fra le varie teorie, si ipotizza che le varianti X4 emergano a seguito della deplezione di cellule immunitarie CCR5<sup>+</sup> o di un' aumentata espressione del CXCR4 da parte dei linfociti ; entrambi i fattori sarebbero dovuti a un avanzamento della malattia. D'altra parte, è anche plausibile che virus X4-tropici siano meglio riconosciuti immunologicamente rispetto agli R5 tropici, a tal punto da potersi replicare attivamente soltanto in seguito a una significativa compromissione del sistema immunitario, che a questo punto fallirebbe nell'identificarli.

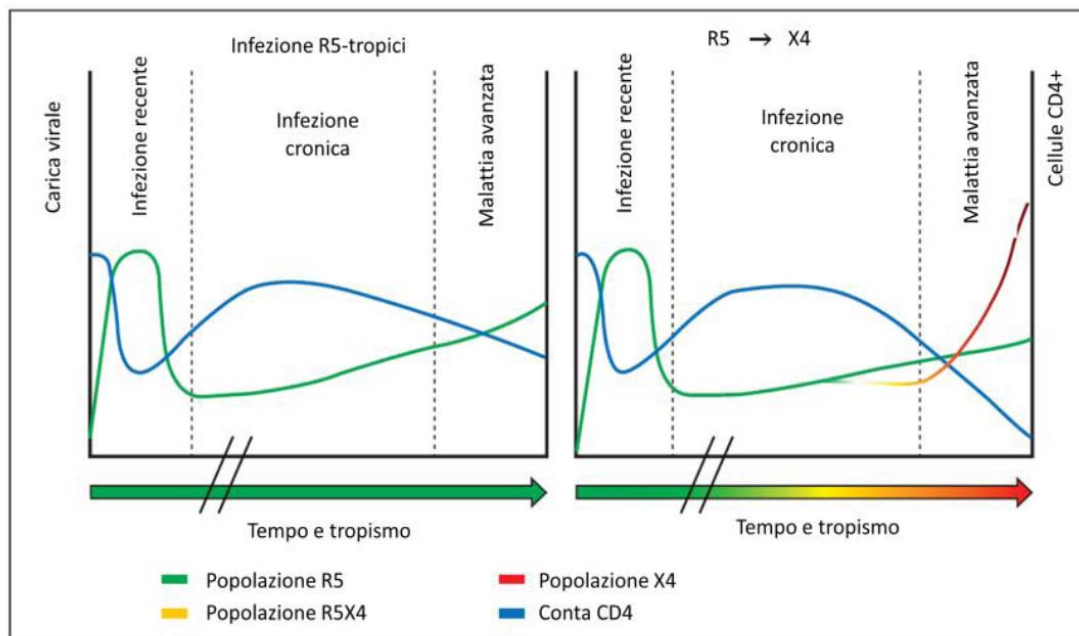


Figura 1.13 Rappresentazione schematica delle tre fasi di infezione da HIV-1: recente, cronica e avanzata, in relazione all'uso del corecettore. (A) Pazienti infettati con virus R5-tropici mostrano un costante aumento della carica virale e lenta riduzione dei linfociti T CD4<sup>+</sup>. (B) Pazienti in cui compaiono varianti X4 mostrano rapido aumento della carica virale e declino dei linfociti T CD4<sup>+</sup>.

Un ulteriore aspetto da chiarire riguarda il potenziale ruolo del tropismo nella risposta alla terapia antiretrovirale combinata (cART). Alcuni studi in passato avevano dimostrato che i pazienti infetti con ceppi MT2(-) avevano un maggior numero di CD4<sup>+</sup> durante i primi 6 mesi di trattamento rispetto ai pazienti MT2(+). La prevalenza di virus X4 è stata associata, dunque, a una più scarsa risposta alla terapia farmacologica (Karlsson et al, 1994). Contrariamente, altri studi hanno fallito nel riportare qualunque correlazione tra l'uso del corecettore e la risposta alla cART. In uno studio più recente (Waters et al, 2008), è stato osservato su 402 pazienti che la presenza di ceppi DM o X4-tropici aveva un effetto

negativo sulla conta dei CD4<sup>+</sup> e un aumentato rischio di sintomatologia clinica, ma non influenzava la risposta al trattamento.

La determinazione del tropismo è un prerequisito fondamentale per l'utilizzo degli inibitori del CCR5. È dunque fortemente raccomandato che la somministrazione di tali farmaci venga preceduta da un approccio fenotipico o genotipico che possa stabilire l'affinità corecettoriale dei ceppi circolanti nel paziente HIV positivo.

### **1.13.6 Test fenotipici per la determinazione del tropismo**

Come accennato precedentemente, il primo saggio fenotipico elaborato per la determinazione del tropismo virale era basato sull'infezione della linea cellulare linfoblastoide MT2, in grado di identificare i virus che inducevano la formazione di sincizi (X4-tropici) e i *nonsyncitium-inducing* (R5). Questo test richiede l'iniziale produzione di virus *in vitro* a partire da cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs) isolate dal paziente; i virioni ottenuti vengono quindi utilizzati per infettare le MT2 ed osservare l'effetto citopatico. In alternativa, i PBMCs del paziente possono essere co-coltivati direttamente con le cellule.

Sebbene tale sistema di determinazione del tropismo sembrava essere estremamente promettente e affidabile in quanto fondato sull'osservazione pratica dell'effetto citopatico, esso presenta alcuni importanti limiti. Innanzitutto la fase iniziale di coltivazione del virus a partire da cellule immunitarie del paziente potrebbe selezionare dei ceppi adattati alla replicazione *in vitro* e quindi diversi dal virus prevalente *in vivo*, riducendo in tal modo l'affidabilità del risultato. In secondo luogo, l'analisi delle varianti ottenute dai PBMCs potrebbe non riflettere le caratteristiche della popolazione virale presente nel compartimento plasmatico, dando origine a dubbi sulla possibilità di ottenere effetti benefici dall'utilizzo del Maraviroc. Inoltre, il saggio sulle MT2 non distingue fra ceppi X4 puri e DM-tropici, in quanto entrambi presentano lo stesso fenotipo *syncitium-inducing*. Infine, i lunghi tempi di incubazione delle MT2 e, di conseguenza, dell'esecuzione del test ne limitano fortemente l'utilizzo nella pratica clinica.

I saggi basati sulla produzione di pseudovirus sono stati sviluppati per evitare la selezione di ceppi indesiderati nelle fasi di coltivazione *in vitro*. Gli pseudovirus vengono ottenuti con le sequenze di Env amplificate dal plasma del paziente e sono utilizzati per infettare cellule reporter. La produzione di questi virioni si ottiene trasfettando cellule epiteliali note come HEK293 con il vettore di espressione di Env insieme a un vettore Env-difettivo, ma contenente un gene per la luciferasi. Gli pseudovirus prodotti vengono quindi utilizzati per inoculare cellule reporter, quali la linea U87 derivante da cellule di glioma umano.

I trials clinici sugli antagonisti del CCR5 si sono basati sulla determinazione del tropismo di HIV-1 attraverso il test fenotipico Trofile, il quale sfrutta la metodologia degli pseudovirus. La soglia di sensibilità minima della prima versione di questo test (Original Trofile Assay, OTA) nella rilevazione delle varianti minori X4 era circa il 10%. In seguito, l'OTA fu sostituito dall'*Enhanced Sensitivity Trofile Assay* (ESTA), una versione la cui sensibilità arriva a 0.3% di rilevazione dei ceppi X4 minoritari. La sensibilità nella rilevazione delle varianti minori è un parametro fondamentale che distingue il saggio

fenotipico dai test genotipici, la cui soglia di identificazione delle specie minoritarie non scende al di sotto del 15-20%. L'importanza di rilevare tali varianti è legato alle osservazioni riportate in alcuni studi in cui è stato dimostrato che la replicazione attiva delle specie virali presenti a bassi livelli prima del trattamento può condurre al fallimento virologico. Tuttavia, la soglia al di sopra della quale le varianti X4 minori possono portare al fallimento virologico, in regime di terapia antiretrovirale basata su antagonisti del CCR5, deve ancora essere stabilita. Due diversi studi hanno dimostrato, attraverso *ultra-deep pyrosequencing*, che le varianti X4 presenti oltre il 2% della popolazione totale influenzano negativamente la risposta al trattamento con Maraviroc. Tuttavia, non tanto la percentuale di X4 quanto il numero assoluto di virioni X4-tropici potrebbe essere rilevante per predire il fallimento virologico.

Uno dei principali vantaggi del test fenotipico consiste anche nell'essere in grado di determinare il tropismo dei sottotipi non-B. La maggior parte degli algoritmi genotipici, infatti, sono stati sviluppati per il sottotipo B, il ceppo più diffuso in Nord-America ed Europa. Tuttavia il sottotipo C è il più diffuso a livello mondiale e le forme ricombinanti del virus stanno emergendo anche nei Paesi industrializzati. I ceppi non-B rappresentano circa il 20% delle forme di HIV-1 circolanti in Europa e tale aspetto deve essere considerato nella gestione degli antagonisti del CCR5. Studi contrastanti riportano una diversa affidabilità dei test genotipici nella predizione del tropismo nei sottotipi non-B, rendendo necessarie ulteriori correlazioni fra questi test e il fenotipo *in vitro*.

Sebbene i test genotipi siano ormai entrati a far parte delle routine diagnostica grazie ai costi ridotti, ai brevi tempi di esecuzione e alle limitate difficoltà tecniche, il fenotipo sugli pseudovirus ricombinanti rimane una pietra miliare nella ricerca e nella prospettiva di trials clinici per gli antagonisti del CCR5. Il fenotipo consente, inoltre, di avere informazioni sul tropismo derivanti dall'intera sequenza di Env, diversamente dal test genotipico che si basa esclusivamente sulla sequenza di V<sub>3</sub>. Le regioni esterne al V<sub>3</sub> non solo influenzano la predizione del tropismo, ma potrebbero essere di fondamentale importanza nell'individuare i patterns di resistenza agli antagonisti del CCR5. Alcune mutazioni esterne al V<sub>3</sub> loop, infatti, sembrano essere coinvolte nella resistenza al Maraviroc, rendendo il test fenotipico l'unico metodo attualmente in grado di identificare tali patterns.

### **1.13.7 Test genotipici per la determinazione del tropismo**

I saggi genotipici si basano sulla predizione dell'uso del corecettore a partire da informazioni contenute nella sequenza virale, mediante sequenziamento del genoma con metodi di clonaggio o di popolazione. Nel primo caso, le singole varianti virali ottenute da paziente vengono clonate, mentre nel sequenziamento di popolazione (*bulk-sequencing*) tutte le quasispecie del virus vengono amplificate ed elaborate in un'unica sequenza. Il *bulk sequencing* è di gran lunga più accessibile per la routine diagnostica ma non è da escludere che verrà presto o tardi sostituito da metodi basati sul clonaggio, quali *l'ultra-deep sequencing* o il *single genome sequencing*, che tuttavia rimangono ancora degli strumenti d'élite soprattutto a causa dei costi elevati. Rispetto ai test fenotipici, i metodi basati sul genotipo sono più semplici dal punto di vista tecnico, più rapidi, più economici e standardizzabili. La predizione genotipica del tropismo tiene conto delle informazioni contenute nella regione di env maggiormente

rilevante nell'uso del corecettore, V<sub>3</sub> appunto. Nel caso del clonaggio, sequenze senza ambiguità vengono sottoposte all'analisi, mentre il *bulk sequencing* può introdurre dei nucleotidi "misti", ovvero posizioni in cui due o più basi differenti possono essere rilevate. Le prime mutazioni in V<sub>3</sub> associate al tropismo furono amminoacidi basici (carichi positivamente) nelle posizioni 11 e/o 25. A questa semplice regola, si aggiunse l'osservazione che la carica netta del peptide risultava essere più elevata nel caso di virus X4 e che anche il numero dei siti di glicosilazione in gp120 poteva correlare con il tropismo (Fig.1.14). Sebbene un buon numero di ceppi virali venga correttamente classificato con queste approcci, l'introduzione di strumenti bioinformatici ha reso l'interpretazione della sequenza più immediata. I metodi bioinformatici più utilizzati per l'interpretazione della sequenza di V<sub>3</sub> sono il *position-specific scoring matrix* (PSSM) e il *Geno2Pheno (G2P) coreceptor*. Entrambi sono definiti *machine learning methods*, ovvero algoritmi che, a partire da un insieme di dati (*database*), ne estrapolano delle caratteristiche comuni, ossia dei predittori che vengono poi ricercati nella sequenza sottoposta ad analisi. Un principio comune di questi metodi si basa sul "training" del modello su cui si basa il software, eseguito attraverso il confronto dei risultati ottenuti con test genotipico e fenotipico su uno stesso campione. Le banche dati utilizzate per il training possono essere il *Los Alamos HIV Sequence Database* o particolari coorti di studi clinici, quali la *HOMER cohort* (Hogg et al, 2001). Mentre il *Los Alamos Database* fornisce dei dati di elevato standard qualitativo sul genotipo e fenotipo ottenuti con metodi di clonaggio, i risultati della coorte HOMER si basano su *bulk sequencing*, e quindi si applicherebbero meglio alla diagnostica di routine (che sfrutta lo stesso metodo). L'analisi con PSSM sfrutta la sequenza primaria del V<sub>3</sub> loop e calcola, per ogni singolo amminoacido, la probabilità che essa derivi da un virus X4. La predizione basata su algoritmi, quali G2P, invece, è più accurata e la flessibilità di questi sistemi consente di inserire delle informazioni aggiuntive che possono migliorare il modello, quali informazioni strutturali utili alla simulazione funzionale del V<sub>3</sub> loop. La predizione di PSSM e di G2P è associata a un punteggio, ovvero a un'informazione quantitativa. PSSM dà una somma dei punteggi per tutte le posizioni in cui le sequenze con lo *score* più alto hanno maggior somiglianza. In G2P il risultato R5 o X4 è associato a un *false positive rate value* (FPR, probabilità di falso positivo), che indica la probabilità che un virus R5 sia classificato erroneamente come variante X4. La scelta di un diverso cut-off di FPR ha un decisivo impatto sul risultato. Se cut-off meno stringenti (ovvero più elevati) riducono infatti la probabilità di classificare erroneamente un virus R5 come X4, aumenta anche la probabilità di ottenere falsi X4 positivi. Sebbene non sia stato mai eseguito un trial clinico che valuti il corretto cut-off di FPR, sarebbe auspicabile un'analisi a posteriori dei dati delle diverse coorti studiate per stabilire il valore soglia ottimale.

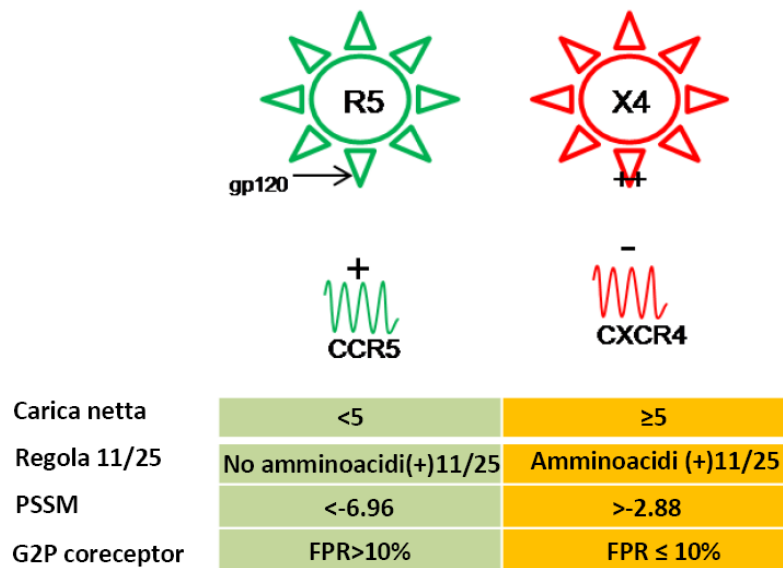


Figura 1.13 Metodi di interpretazione della sequenza di V3

Gli algoritmi basati su *machine learning methods* sono certamente caratterizzati da una maggiore sensibilità di predizione (40/60%) rispetto alle tradizionali regole di interpretazione di V<sub>3</sub>, ma forniscono una predizione binaria, non discriminando le varianti DM-tropiche. Inoltre, il *bulk sequencing* ha la capacità di rilevare le varianti minori in un campione se presenti almeno per il 15-20% all'interno della popolazione. Per aumentare la sensibilità nella rilevazione di queste specie nei campioni di DNA e di plasma con carica virale < 1000 copie/mL, alcuni gruppi hanno condotto studi sul tropismo eseguendo il test genotipico in triplicato, ma con risultati non del tutto concordanti. In alcuni casi, l'analisi in triplicato con un FPR al 10%, aumenta l'incidenza di predizione X4 del 4%, mentre in altri si osserva la stessa proporzione rispetto al test in singolo (Symons et al, 2012; De Luca, 2012). Per verificare se il test in triplicato sia in grado di aumentare la sensibilità delle varianti minori, sarebbe necessario uno studio prospettico che confronti il risultato del test in singolo/triplicato e l'*outcome* del trattamento con Maraviroc.

### 1.13.8 Tropismo e carica netta del V3 loop

L'evidenza che la carica netta del peptide V<sub>3</sub> fosse associata al tropismo è riportata in alcuni lavori (Clevestig et al, 2006), sebbene la spiegazione biologica di questa relazione non sia ancora completamente nota. Recentemente, un gruppo di ricercatori (Yokoyama et al, 2012), ha osservato, attraverso sofisticate tecniche di simulazione dinamica molecolare, che nei virus in cui la carica netta del V<sub>3</sub> è più bassa (NC = +3), la porzione di gp120 bersaglio di anticorpi neutralizzanti è meno esposta rispetto ai virus in cui NC = +7. Di conseguenza, i virus con bassa NC subirebbero una minor pressione selettiva da parte del sistema immunitario e un minor tasso di variabilità in env.

### **1.13.9 Tropismo e sottotipi non-B**

Un aspetto tanto importante quanto dibattuto riguarda la maggior propensione di alcuni sottotipi non-B di evolvere in ceppi X4. È noto che in circa il 50% dei pazienti infetti con sottotipo B si ha uno switch del corecettore da R5 a X4 con tempi variabili tra i soggetti. Il sottotipo D, che filogeneticamente è vicino al ceppo B, sembra avere una maggior propensione allo switch, mentre il sottotipo C sarebbe meno incline, nonostante vi siano in proposito degli studi discordanti. Dal momento che tutti i virus possono evolvere in varianti X4 con tempistiche diverse, è plausibile che sia la distanza evolutiva fra il sottotipo e le caratteristiche genetiche dei virus X4-tropici a determinare la rapidità del cambiamento. Inoltre, l'HIV GRADE network ha analizzato i dati ottenuti dalla routine diagnostica sottolineando le differenze nella distribuzione del tropismo fra i vari sottotipi. In questo caso l'uso del corecettore è stato predetto con G2P e un cut-off di FPR del 10%. Dallo studio è emerso che esiste una significativa differenza fra la prevalenza di X4 nei sottotipi CRF01\_AE e D rispetto ai sottotipi A1 e G. Per i ceppi F e B non è stata invece osservata una differenza significativa nella prevalenza di R5 e X4 rispetto alla distribuzione media dei sottotipi. Per quanto riguarda il sottotipo C vi sono dei dati discordanti, probabilmente dovuti al fatto che i sistemi di interpretazione delle sequenze sono stati sviluppati su datasets di campioni B. Un approccio utile potrebbe essere la scelta di un diverso cut-off di FPR, in base al singolo sottotipo.

## 2. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questa tesi è stato di valutare se esistono correlazioni tra l'evoluzione del tropismo, i livelli dell'HIV-1 DNA cellulare e i parametri immunologici in una popolazione di pazienti naive trattati con successo.

In specifico dalla coorte CAVeAT, che è costituita da pazienti HIV-1 positivi arruolati a partire dal 2004 da 5 unità di malattie infettive della regione Veneto, sono stati selezionati retrospettivamente due sottogruppi di 219 e 181 pazienti (coorte I e coorte II).

Nella coorte I, abbiamo valutato se il tropismo virale per CXCR4 o CCR5 di HIV-1 rilevato nei PBMCs correlava con la quantità di HIV-1 DNA, la viremia residua e la conta dei CD4<sup>+</sup> con un'analisi trasversale su pazienti trattati e uno studio longitudinale su più tempi di osservazione.

Nella coorte II, è stata studiata longitudinalmente la quantità e la cinetica dell'HIV-1 DNA cellulare per valutare se correlavano con i valori di HIV-1 RNA al *baseline*, la viremia residua, la conta dei linfociti CD4<sup>+</sup> e il fatto di avere un'infezione acuta prima di iniziare la terapia antiretrovirale..





## 3. MATERIALI E METODI

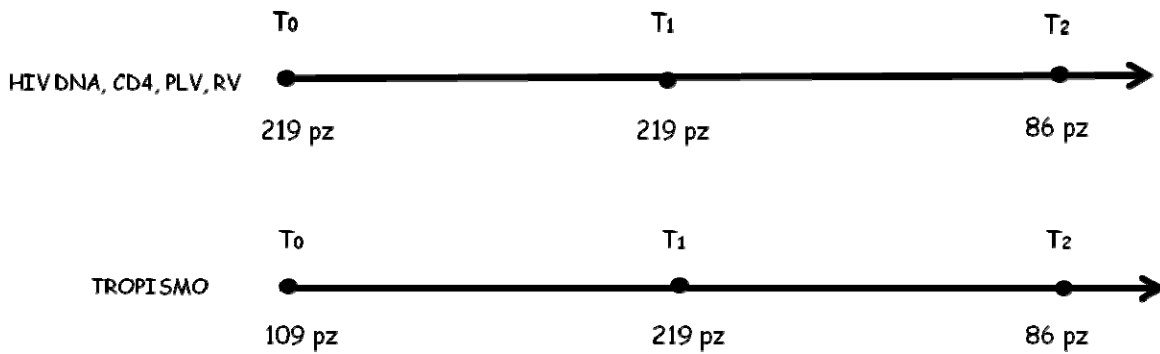
### 3.1 Disegno dello studio

La coorte veneta CAVeAT è costituita da pazienti HIV-1 positivi arruolati a partire dal 2004 da 5 unità di malattie infettive della regione Veneto. A partire da questa coorte sono stati selezionati retrospettivamente due sottogruppi di 219 e 181 pazienti (coorte I e coorte II).

Per essere arruolati nello studio, i pazienti dovevano avere i seguenti criteri di eleggibilità: avere un'infezione da HIV documentata; essere maggiorenni; non essere mai stati trattati con terapia antiretrovirale efficace prima dell'inizio dello studio (paziente naive); avere raggiunto livelli di viremia plasmatica non rilevabili, inferiori a 50 copie/ml, entro i 6 mesi dall'inizio della terapia mantenendo livelli non rilevabili per tutta la durata dello studio; non avere più di un blip virale per anno (HIV RNA da 50 a 1000 copie/ml) dopo aver raggiunto una soppressione della viremia, che è stato valutato da almeno 4 analisi del sangue all'anno; poter ricorrere ad un solo cambiamento del regime terapeutico nel caso esso sia dovuto ad intolleranza agli effetti collaterali; non essere stati trattati con gli antagonisti del CCR5; se donna, non essere in gravidanza ed infine avere fornito il consenso informato per la partecipazione allo studio.

I campioni di sangue sono stati lavorati e stoccati al baseline (prima dell'inizio della terapia), al primo follow-up ( $T_1$ ), al secondo follow-up ( $T_2$ ) e quando possibile anche al terzo ( $T_3$ ).

Per quanto riguarda la coorte I, il  $T_1$  era definito come il primo follow-up dopo il raggiungimento della soppressione virologica avvenuta in un range da 12 a 72 mesi (mediana 36), mentre il  $T_2$  era costituito da un follow-up con una mediana di 16 mesi dopo il  $T_1$ . Su tutti i 219 pazienti sono state effettuate le seguenti analisi viroimmunologiche: l'avidità anticorpale, la viremia plasmatica, il numero di cellule T  $CD4^+$ / $\mu$ L, la quantità di HIV-1 DNA. L'analisi del tropismo è stata eseguita su tutti i pazienti disponibili al  $T_1$  e  $T_2$  (rispettivamente 219 e 86), ma al  $T_0$  solo in un sottogruppo di 109 pazienti a causa dell'esaurimento dei campioni stoccati, dato che questa coorte era stata precedentemente valutata in un altro studio sul DNA (Parisi SG et al., 2012) (Fig 3.1).

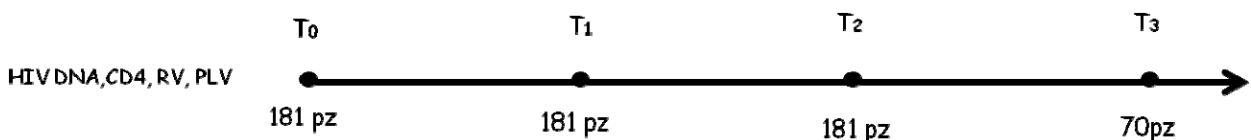


**Fig 3.1** Schema dei pazienti valutati nella coorte I per lo studio longitudinale dell'evoluzione del tropismo X4/R5 correlato con i parametri viroimmunologici e la viremia residua (PLV= viremia plasmatica, RV = viremia residua, T<sub>0</sub> = baseline, prima dell'inizio della terapia, T<sub>1</sub> = mediana 36 mesi, range 12-72 mesi e T<sub>2</sub> = 16 mesi dopo T<sub>1</sub>).

Nella coorte II sono stati analizzati i campioni di 181 pazienti al baseline, al T<sub>1</sub> (raggiungimento della soppressione virologica dopo una media di 24 mesi (range  $\pm 12$  mesi)) e al T<sub>2</sub>, ovvero 12 mesi dopo il T<sub>1</sub>. Per un sottogruppo di 70 pazienti, è stato possibile valutare anche un terzo tempo di follow-up (T<sub>3</sub>, distanziato di 12 mesi ( $\pm 2$  mesi) dal T<sub>2</sub>).

Su tutti i pazienti sono state effettuate le seguenti analisi viroimmunologiche: l'avidità anticorpale, la viremia plasmatica, il numero di cellule T CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ L e la quantità di HIV-1 DNA ( Fig 3.2).

Le analisi genotipiche per rilevare i sottotipi di HIV sono state condotte come precedentemente descritto (Parisi SG, et al. 2007).



**Fig 3.2** Schema dei pazienti valutati nella coorte II per lo studio longitudinale dei livelli di HIV-1 DNA cellulare correlati con i parametri viroimmunologici e la viremia residua (PLV= viremia plasmatica, RV = viremia residua, T<sub>0</sub> = baseline, prima dell'inizio della terapia, T<sub>1</sub> = media 24 mesi, range  $\pm 12$  mesi, T<sub>2</sub> = 12 mesi dopo T<sub>1</sub> e T<sub>3</sub> = 12 mesi, range  $\pm 2$  mesi dal T<sub>2</sub>).

### 3.2 Preparazione dei campioni

Il sangue intero di ogni paziente HIV-1 positivo è stato prelevato in provette da emocromo contenenti come anticoagulante l'EDTA. I campioni sono pervenuti presso il laboratorio di biologia molecolare del reparto di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova entro 6 ore dal prelievo e mantenuti costantemente a 4°C fino al momento della preparazione.

I campioni sono stati trattati nel laboratorio di sicurezza livello 3 (BL3). Per ottenere la frazione plasmatica, i campioni di sangue periferico sono stati centrifugati a 1200 x g per 10 min e successivamente il plasma è stato prelevato, aliquotato e conservato a -80°C.

La componente cellulare ottenuta in seguito a centrifugazione è stata risospesa con del tampone PBS e fatta percolare sopra un isovolume di *Ficoll-HyPaque Plus* (GE Helthcare, Svezia). Dopo centrifugazione per gradiente di densità a 1700 x g per 30 minuti, i diversi strati così ottenuti contenevano diverse tipologie cellulari (Wootawa et al., 1974).

La frazione cellulare di PBMCs è stata raccolta e trasferita per essere lavata due volte con la soluzione tampone PBS; successivamente la soluzione cellulare è stata contata tramite COULTER COUNTER (Beckman Coulter, CA USA) in modo da ottenere aliquote contenenti circa  $1 \times 10^6$  cellule. Le cellule sono state stoccate a -80°C in parte contate e in parte non contate in soluzione contenente siero fetale bovino (FBS) scomplementato e dimetilsolfossido (DMSO) come agente crioconservante vitale.

Campioni di sangue sono stati archiviati al baseline ( $T_0$ , prima dell'inizio della terapia), al primo e secondo follow-up ( $T_1$  e  $T_2$ ) e, quando disponibile, ad un ulteriore tempo di follow-up ( $T_3$ ).

### 3.3 Test di avidità anticorpale

Il test dell'avidità anticorpale è stato eseguito sui campioni di plasma al  $T_0$  utilizzando il kit dell'Abbott HIV Ab/Ag COMBO (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany). Come descritto nello studio di Suligoi B et al, 2003, due aliquote da 20  $\mu$ l ciascuna (stesso campione di plasma), sono state diluite 1:10; una con il buffer di diluizione incluso nel kit (aliquota B) e l'altra con una soluzione 1 M di guanidina idrocloruro (aliquota G). Dopo un'incubazione a temperatura ambiente per 5 min, le aliquote sono state saggate tramite metodo EIA di IV generazione basato su un saggio di chemiluminescenza che sfrutta le microparticelle paramagnetiche (CMIA). Da quando il saggio è stato automatizzato, lo step modificato è stato solo quello di preparazione del campione, ovvero diluendo 1:10 il campione in fase pre-analitica; gli steps successivi non sono stati modificati. Lo strumento utilizzato è stato l'*Architect I-iSR50079* della ditta Abbott (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany).

Il test è un metodo che si sviluppa in due passaggi. In un primo passaggio si combinano campione, diluente e microparticelle paramagnetiche. L'antigene p24 e gli anticorpi anti HIV-1/2 presenti nel campione si legano alle micro particelle ricoperte di antigeni HIV-1/HIV-2 e anticorpi monoclonali di topo contro p24. Dopo il lavaggio gli antigeni p24 e gli anticorpi anti HIV-1/HIV-2 si legano ai coniugati marcati con acridinio. Dopo un ulteriore lavaggio si aggiungono le soluzioni di pre-trigger e di trigger alla mix di reazione. La chemiluminescenza risultante è letta come unità di luce relativa (RLU).

Il sistema *Architect* calcola il cutoff (CO) moltiplicando la media del segnale chemiluminescente (RLU) di tre replicati del calibratore 1 per un numero fisso dato dal produttore (0.40). I risultati dei campioni (S) sono stati espressi come indice S/CO; campioni con valore  $< 1.00$  sono considerati non reattivi, mentre con indice  $\geq 1$  sono considerati positivi. L'indice di avidità anticorpale (AI) è stato calcolato utilizzando la seguente formula :  $AI = (S/CO_G) / (S/CO_B)$ . Basandoci su lavori precedenti, che riportano il cutoff di

0.80 come il valore di AI corrispondente ad una siero conversione di 6 mesi utilizzando l'Architect HIV Ag/AB Combo (Suligoi et al, 2011), i campioni di plasma con  $AI \leq 0.80$  sono stati classificati come "infezione recente".

### 3.4 Quantificazione della viremia plasmatica

I livelli di HIV-1 RNA sono stati misurati nel plasma tramite il saggio Abbott *RealTime* HIV-1 (Abbott Laboratories, Illinois, USA), che utilizza la tecnologia della Realtime PCR per rilevare diversi sottotipi del gruppo M e isolati del gruppo O. Il dosaggio è standardizzato in base ad uno standard virologico del Virology Quality Assurance Laboratory of the AIDS Clinical Trial Group (Yen- Lieberman B et al., 1996) e al Primo Standard Internazionale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità per l'HIV-1 RNA (Davis C et al., 2003).

La sequenza bersaglio del dosaggio Abbott *RealTime* HIV-1 è situata nella regione integrasi del *pol* del genoma dell'HIV-1. Tale regione è altamente conservata (Myers G et al, 1994). I primer sono realizzati in modo tale da ibridare in corrispondenza della regione integrasi del *pol* con il minor numero possibile di "mismatch" tra i vari sottotipi.

Il dosaggio Abbott *RealTime* HIV-1 offre fino a quattro opzioni di volume del campione: 0,2 ml, 0,5 ml, 0,6 ml e 1,0 ml. Noi abbiamo utilizzato l'opzione da 1 ml con il LOD del dosaggio di 40 copie/ml. Il LOD è stato stabilito analizzando le diluizioni di uno standard virale proveniente dal laboratorio Virology Quality Assurance del gruppo di sperimentazione clinica AIDS.

Tutti i campioni sono stati centrifugati a 2.000 g per 5 minuti prima di analizzarli; le diluizioni sono state effettuate in plasma umano negativo per l'HIV-1.

Il limite superiore della determinazione quantitativa (ULQ) del dosaggio Abbott *RealTime* HIV-1 è di 10 milioni di copie/ml, mentre il limite inferiore della determinazione quantitativa è equivalente al LOD (40 copie/ml per le procedure di volume del campione di 1,0 ml e di 0,6 ml; 75 copie/ml per la procedura di volume del campione di 0,5 ml e 150 copie/ml per la procedura di volume del campione di 0,2 ml).

La concentrazione di HIV-1 RNA virale in un campione o controllo è stata calcolata in base alla curva di calibrazione memorizzata. I risultati dei dosaggi possono essere riportati in copie/ml, log [copie/ml], Unità Internazionali (IU)/ml o log [IU/ml]; (1 IU = 0,58 copie, 1 copia = 1,74 IU).

I valori di viremia plasmatica e di cellule T CD4<sup>+</sup>/μL, ai vari tempi di follow-up, sono stati ricavati dalle cartelle cliniche dei singoli pazienti o dal sistema informatico dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

### 3.5 Quantificazione della viremia residua

La viremia residua è stata quantificata nei pazienti che avevano una viremia plasmatica non rilevabile con i tradizionali metodi (< 20 copie/ml) usando il metodo ultrasensibile basato sul test modificato Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5 (Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey, USA), con un limite di rilevabilità di 2.5 copie/ml (Andreoni M et al., 2000; Nicastri E et al. 2008).

Le modifiche includono pellettare il virus partendo da 2 ml di plasma centrifugando il campione a 23.600 x g a 4°C per 2 ore, risospesando il pellet virale in 50µl di diluente e aggiungendo metà del normale volume di standard.

L'intero volume di RNA virale risospeso è stato utilizzato nel saggio di trascrizione inversa e amplificazione mediante PCR seguendo le indicazioni fornite dal produttore dello strumento.

### **3.6 Estrazione del DNA cellulare dai linfomonociti del sangue periferico**

Il DNA totale è stato estratto partendo da  $1 \times 10^6$  cellule utilizzando il kit *QIAmp DNA mini kit Handbook* (Qiagen). L'estrazione è stata eseguita seguendo il protocollo *Blood Spin Protocol*, che utilizza colonnine contenenti una membrana di silice per catturare l'acido nucleico. Dopo aver risospeso il pellet cellulare con 250 µL di PBS, ad ogni singola aliquota sono stati aggiunti 10 µL di sodio dodecil solfato (SDS) 2%, 400 µL di buffer di lisi e 20 µL di proteinasi K. Quindi i campioni sono stati posti ad incubare a 56°C per 15 min.

Successivamente sono stati aggiunti 500 µL di etanolo al 96% in modo da far precipitare l'acido nucleico.

Ogni singolo campione è stato caricato su colonnina e dopo centrifugazione a 8000 rpm per 1 min, il filtro è stato sottoposto a due lavaggi con le soluzioni AW1 e AW2 del kit.

Ogni colonnina infine è stata trasferita su una eppendorf da 150 µL, in modo che dopo aver imbibito il filtro con 100 µL di buffer BE e centrifugazione a 8000 rpm per 1 min, è stato possibile eluire il DNA nella provetta. Il DNA è stato conservato a -20°C.

### **3.7 Determinazione quantitativa del DNA totale di HIV-1 nei linfomonociti**

Il numero di copie di HIV DNA cellulare, partendo dai linfomonociti del sangue periferico, è stato quantificato tramite *Real time* PCR, ad oggi ritenuta il *gold standard* per la determinazione quantitativa di HIV-DNA (Viard JP, et al. 2004; Sarmati et al., 2005).

Tutte le prove sono state eseguite utilizzando un sistema di Real-Time PCR (ABI PRISM 7900 HT *Sequence Detection System Applied Biosystems*) e delle sonde TaqMan (marcate con il gruppo fluoroforo FAM in 5' e TAMRA legato covalentemente all'estremità 3').

Al fine di ottenere una quantificazione dell'HIV-DNA cellulare, ciascuna corsa di Real-Time PCR è stata condotta amplificando in parallelo una curva standard ottenuta mediante diluizioni in base 10 di soluzioni contenenti quantità note di HIV DNA ottenute dalla linea cellulare 8E5 che contiene una copia di HIV-DNA integrato in ogni cellula, con una sensibilità del metodo di 5 copie HIV-DNA/ $10^6$  cellule (Nicastri E, et al. 2008).

Come controllo interno, e ai fini di quantificare l'HIV-DNA in rapporto al numero di cellule, si è proceduto alla quantificazione di una quantità nota di un gene *housekeeping*, ovvero del gene della β-globina o BGL che, considerato il genoma diploide umano, è presente in due copie per cellula.

All'interno di ogni esperimento le analisi sono state eseguite in doppio sia per HIV-1 che per la beta-globina, in un volume finale di 25 µl e sono state calcolate le medie dei dati ottenuti. L'elaborazione dei dati ottenuti è stata effettuata mediante il software SDS 3.1 fornito dal produttore dello strumento. Quando i valori dei delta del ciclo soglia ( $\Delta ct$ ) risultavano essere più del 10%, il campione è stato rianalizzato.

I campioni baseline e follow-up di un paziente sono sempre stati analizzati all'interno dello stesso esperimento; è stato possibile eseguire questa procedura perché sono stati considerati dei pazienti selezionati retrospettivamente e che quindi presentavano un set completo di campioni ( $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  e quando possibile anche un  $T_3$ ). Un campione analizzato precedentemente è stato regolarmente aggiunto come controllo interno.

### 3.8 Genotipizzazione del tropismo virale nei PBMCs

Le analisi genotipiche del tropismo virale sono state eseguite sul DNA dei linfomonociti del sangue periferico come precedentemente descritto (Parisi SG et al. 2011).

Brevemente, sequenze della regione  $V_3$  interna al gene *env*, sono state amplificate tramite la messa a punto di un protocollo di Nested PCR. A tal scopo sono stati utilizzati dei primers in grado di amplificare  $V_3$  nei diversi sottotipi: nella prima PCR abbiamo utilizzato dei primers esterni alla regione da amplificare, mentre per la Nested PCR è stata usata una coppia di primers interni (Sarmati L. et al, 2010).

I primers, sono stati utilizzati a una concentrazione finale di 0.1 µM in un volume di reazione di 50 uL. Per la reazione di Nested PCR è stato utilizzato 1 uL del prodotto di PCR. Successivamente il prodotto di PCR è stato caricato in gel di agarosio al 2% per verificare la riuscita della reazione. In ogni corsa elettroforetica è stato utilizzato un marcatore di peso molecolare (Marker VIII, (Boehringer; 0,25 µg/mL)) La banda ricercata era di circa 447 bp.

I prodotti della Nested positivi in gel di agarosio sono stati purificati con il reattivo *ExoSAP-IT* (*Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase*); l'Esonucleasi I degrada i primers residui ed altri residui di DNA prodotti dalla PCR, mentre la fosfatasi alcalina idrolizza i rimanenti dNTPs, dando come prodotti nucleotidi e gruppi  $P_i$  liberi.

#### 3.8.1 Sequenziamento

Dopo aver amplificato il tratto del gene Env contenente la sequenza  $V_3$ , il prodotto di reazione è stato genotipizzato tramite PCR di sequenziamento. La reazione di sequenziamento segue i principi della tecnica sviluppata nel 1977 da Fred Sanger, una metodica di sequenziamento di tipo enzimatico, conosciuta come "metodo della terminazione di catena" o più semplicemente *metodo di Sanger*. Il principio della tecnica sviluppata da Sanger si basa sulla sintesi *in vitro* di DNA eseguita in presenza di nucleotidi modificati, ovvero *dideoossiribonucleotidi trifosfato* che interrompono la sintesi della catena nel momento in cui vengono aggiunti ad essa. Grazie a questo sistema, si ottengono dei frammenti di dimensioni diverse che consentono di ricostruire la sequenza stampo. Per ogni campione di cui è stato

sequenziato il dominio V3 del gene Env sono state preparate 4 provette di reazione, ognuna contenente: 5 µl di primers E3 (forward) ed E4 (reverse) 1µM specifici per la regione V<sub>3</sub> (Parisi et al, 2011); 2 µl di Buffer Mix 5X, contenente la DNA polimerasi (*AmpliTaq DNA polimerasi*), dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), MgCl<sub>2</sub> e 2 µl di Bg Dye terminatore 3.1, contenente i *dideossinucleotidi* trifosfato marcati con quattro diversi gruppi fluorofori in quantità stechiometricamente inferiori ai deossiribonucleotidi non marcati, in modo da permettere un'elongazione del filamento sufficiente per l'analisi.

Le reazioni di sequenza così prodotte sono state purificate tramite l'utilizzo delle colonnine CENTRI-SEP dell'Applied Biosystems. Infatti le strips di colonnine sono raccomandate per una rimozione veloce ed efficiente dell'eccesso dei terminatori di catena dalle reazioni di sequenziamento; inoltre sono utili anche per rimuovere l'eccesso di nucleotidi, piccoli primers, precursori fluorescenti e radioattivi e buffers.

Le colonnine sono piene di una matrice gel di separazione idratata, quindi prima dell'utilizzo devono rimanere a temperatura ambiente per almeno due ore in modo da poter rimuovere l'acqua in eccesso con una centrifugata a 2300 x g per 2 min. A questo punto, le colonnine sono state poste al di sopra di una piastra da 96 pozzetti; quindi, abbiamo caricato 20µL del campione direttamente al centro del pozzetto di ogni colonnina usando una multicanale. Dopo una centrifugata a 2300 x g per 3 min sono state recuperate le sequenze e le colonnine sono state scartate. La piastra contenente le sequenze purificate è stata caricata nel sequenziatore automatico a 16 capillari *ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Il sequenziatore utilizza il metodo di separazione elettroforetica dei frammenti fluorescenti in un capillare di diametro di 50 µL contenente un polimero di corsa. Il sistema carica automaticamente il polimero nei singoli capillari, in modo che quando i frammenti delle sequenze di DNA vengono caricati, essi possano separarsi lungo tutta la lunghezza dei capillari tramite corsa elettroforetica. In questo modo i nostri frammenti sono stati separati in base alla loro lunghezza in gel di poliacrilammide e, man mano che "corrono" lungo il capillare, raggiungono la "detection window" che traduce la diversa fluorescenza con un picco di colore diverso. Infatti l'intensità e la lunghezza d'onda delle emissioni fluorescenti vengono captate durante l'elettroforesi quando i frammenti di DNA, eccitati dalla luce del laser, passano davanti ad un rivelatore che traduce la diversa fluorescenza (corrispondente ai diversi ddNTPs terminatori) con un picco di colore diverso. I cromofori, passando davanti al rivelatore, sono eccitati alla lunghezza d'onda di 448 nm, ed emettono ad una lunghezza d'onda variabile tra 500 e 700 nm.

La sequenza di DNA è determinata da un software in grado di interpretare le misure di fluorescenza registrate dal rivelatore e di elaborarle opportunamente; le informazioni vengono integrate e trasformate in un tracciato o elettroferogramma, in cui picchi di colore diverso, con aree proporzionali all'intensità di emissione, corrispondono a nucleotidi diversi; da questo ne risulta la sequenza nucleotidica di quella determinata regione di DNA (Fig 3.3).

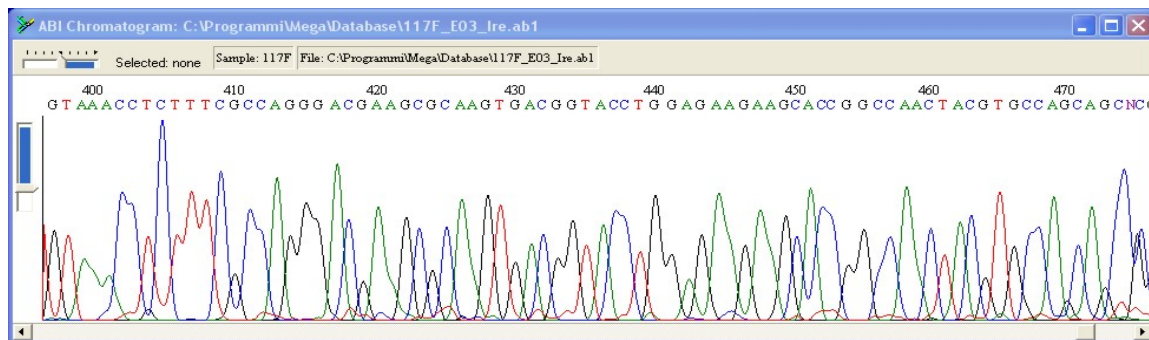


Fig. 3.3: Elettroferogramma di una sequenza nucleotidica.

### 3.8.2 Predizione del tropismo virale mediante *Geno2pheno coreceptor*

I test genotipici per la predizione del tropismo di HIV-1 (determinazione del fenotipo virtuale), dipendono dall'abilità di interpretare le sequenze del V<sub>3</sub> loop ottenute da ciascun campione; esse sono state esaminate, nel nostro studio, sfruttando il database e il software di allineamento *Geno2pheno coreceptor* (G2P) (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>, accessed by June 2012), algoritmo online che consente di ottenere una predizione del tropismo virale grazie ad allineamento multiplo di sequenze depositate nel database con affinità corecettoriale nota.

Dopo aver sottomesso nel sistema la sequenza nucleotidica, il software effettua un allineamento multiplo; la somiglianza tra il consensus del database (con tropismo CCR5) e la sequenza query (con tropismo ignoto) è espressa con un valore percentuale di FPR (false positive rate). Inoltre questo algoritmo utilizza la sequenza nucleotidica ottenuta e la trasforma automaticamente in sequenza aminoacidica. In questo modo si arriva alla sequenza aminoacidica della regione V<sub>3</sub>.

Per poter effettuare l'allineamento, G2P richiede all'operatore l'impostazione di uno specifico *cut-off*, ovvero una soglia (che varia da 1% a 20%) in base alla quale le sequenze con FPR inferiore vengono classificate come virus X4-tropici. La scelta del cut-off determina la stringenza di analisi, ovvero un aumento di FPR dal 10% al 20% comporta un aumento della sensibilità di identificazione di virus X4, ma anche della percentuale di falsi X4- tropici.

Alcuni studi riportano che il miglior cut-off di FPR per la predizione del tropismo mediante G2P sia di 5.75% (Chalmet K et al., 2012; Swenson LC et al, 2011) in quanto tale soglia permetterebbe di avere un'elevata corrispondenza con il risultato del test fenotipico. D'altra parte, le *European Guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing* (pubblicate in *The Lancet* a Marzo 2011) mettevano in risalto l'esigenza di discutere il limite di FPR nella *routine* diagnostica per aumentare la sensibilità di individuazione degli X4, in quanto un falso negativo (ovvero un virus X4 identificato come R5) poteva essere causa di fallimento terapeutico in caso di somministrazione non opportuna del *Maraviroc*. Fra le conclusioni delle linee guida veniva suggerito di aumentare il cut-off al 20% in caso di analisi in singolo di DNA provirale o di plasma con carica virale inferiore alle 1000 copie/mL, mentre per campioni con carica virale maggiore di 1000 copie/mL si suggeriva un cut-off del 10%. Le sequenze V<sub>3</sub> dello studio qui



riportato sono state analizzate impostando il cut-off del FPR del 20% (20% di probabilità di classificare erroneamente un R5 come X4), dato che questo algoritmo ha dato una miglior predizione nello studio genotipico del tropismo.

Inoltre prima di imputare le sequenze in GP2, le sequenze che avevano degli elettroferogrammi ambigui, inteso come più di due doppi picchi al limite di distinzione, sono state ripetute. I campioni sono stati esclusi se i risultati venivano riconfermati; infatti i campioni di 7 pazienti non sono stati inclusi nello studio proprio per questo motivo. Quando una singola o doppia ambiguità hanno dato risultati discordanti in termini di FPR, le sequenze sono state ripetute. Inoltre tutti i risultati che nello studio longitudinale sono risultati discordanti sono stati eseguiti due volte, per confermare il cambio di tropismo; allo stesso modo, tutti i campioni con un valore di *false positive rate* (FPR) compreso tra il 10% e il 30%, sono stati confermati da una seconda analisi ripetendo l'amplificazione del campione. In conclusione, abbiamo determinato e considerato esserci un effettivo switch virale solo nei casi di due predizioni concordanti.

### 3.9 Analisi statistiche

Sono state prese in esame le seguenti variabili, valutate come variabili continue: età, conta assoluta e percentuale dei linfociti T CD4<sup>+</sup> nel sangue (numero di cellule/ $\mu$ l) al baseline e follow-up;  $\log_{10}$  delle copie di HIV-1 DNA ( copie/ $10^6$  PBMCs) al baseline e follow-up;  $\log_{10}$  delle copie di HIV-1 RNA (copie/ml) al baseline.

Come variabili binarie, sono state considerate: i valori di HIV-1 RNA al di sotto del limite più basso di quantificazione (< 2.5 copie/ml) al follow-up, essere in *primary* al momento dell'inizio della terapia, essere straniero, il sesso, i fattori di rischio (eterosessuali, omosessuali, utilizzo di droghe), avere tropismo R5 o X4 nei PBMCs.

Tutte le variabili sono state valutate con un'analisi di correlazione a coppie per delineare i rapporti nell'analisi di popolazione. Quando almeno una variabile era continua, la correlazione è stata dimostrata da un'analisi di regressione lineare. Quando entrambe le variabili erano categoriche (binarie), per dimostrare le correlazioni, è stato usato il test del chi-quadrato di Pearson ( $\chi^2$ ); quando in una tabella di contingenza 2 x 2 era presente 0, è stato usato il *Fisher's exact test* al posto del *test del  $\chi^2$* .

Abbiamo eseguito un'ulteriore analisi statistica basata sulla rilevazione del tropismo X4 e R5 come variabile binaria e i pazienti organizzati in gruppi (molti pazienti avevano ripetuto le analisi). Unificando i tempi di follow-up con una scala di tempo in comune, è stata eseguita una regressione lineare multilivello, usando come *outcome* la viremia residua rilevata sotto i livelli di threshold, e le seguenti covariate:  $\log_{10}$ DNA,  $\log_{10}$ RNA al baseline, X4R5 (variabile binaria), e il tempo. Quando appropriato sono state applicate anche analisi statistiche descrittive convenzionali.



## **4. RISULTATI**

### **4.1 Coorte I**

#### **4.1.1 Caratteristiche dei pazienti della coorte I**

I dati demografici, virologici e immunologici, riguardanti i 219 soggetti arruolati nello studio di coorte I, sia per quanto riguarda l'intera popolazione che per quanto riguarda i sottogruppi di pazienti con tropismo R5 e X4, sono riportati nella Tabella 1. I pazienti arruolati erano per lo più rappresentati da maschi italiani e infettati dal virus HIV-1 con sottotipo B, mentre tra i fattori di rischio valutati, quelli più importanti erano le abitudini sessuali. Circa il 13,2 % aveva un'infezione acuta all'inizio della terapia. I portatori di genotipo R5 erano i più rappresentativi (il 66.6%). I pazienti con un virus X4 tropico avevano un'età superiore rispetto a quelli con virus R5 ( $p = 0.0332$ ). L'analisi dei parametri viro-immunologici, nel nostro studio realizzata al baseline, prima dell'inizio della terapia HAART, mostrava come nei pazienti con virus R5, piuttosto che in quelli con X4, la conta dei CD4<sup>+</sup> al baseline era significativamente più alta ( $p = 0.0216$ ) (valore della mediana 284 cellule, range 0–810 rispetto a 201 cellule e range 7–1090). Tra i due sottogruppi R5 e X4 non sono state trovate altre differenze statisticamente significative. Considerando il tempo di follow-up T<sub>1</sub>, 83 su 219 soggetti valutati (37.9%) presentavano livelli di HIV-1 RNA inferiori a 2.5 copie/ml. Di questo sottogruppo, 62 soggetti (42.4%) ospitavano un virus R5 tropico mentre 21 in soggetti (28.7%) albergava un virus X4. Questa differenza, tuttavia, non raggiunge la significatività statistica.

	<b>Totale</b>	<b>Sottogruppo di pazienti R5</b>	<b>Sottogruppo di pazienti X4</b>	<b>p-value</b>
<b>Numero</b>	219	146	73	ns
<b>Maschi (n)</b>	173	118	55	ns
<b>Italiani (n)</b>	180	114	66	ns
<b>Età<sup>a</sup> (anni)</b>	41 (19-79)	40 (19-74)	43 (21-79)	P = 0.0332
<b>Fattori di rischio<sup>b</sup></b>				
Eterosessualità (n)	91	60	31	ns
MSM (n)	67	47	20	ns
Utilizzo di droghe (n)	18	11	7	ns
Altro (n)	43	28	15	ns
<b>Sottotipo B (n)</b>	171	113	56	
<b>Primary<sup>c</sup> n (%)</b>	29 (13.2%)	21 (14.3%)	8 (11%)	ns
<b>T<sub>0</sub> CD4 cell/mm<sup>3a</sup></b>	260 (0-1090)	284 (0-810)	201 (7-1090)	P = 0.0216
<b>T<sub>0</sub> CD4%<sup>a</sup></b>	16 (0-39)	17 (0-37)	13 (1-39)	ns
<b>T<sub>0</sub> HIV RNA<sup>a</sup> copie/ml</b>	101836 (412-1x10 <sup>7</sup> )	101836 (412-1x10 <sup>7</sup> )	1000182 (547-6258236)	ns
<b>T<sub>0</sub> HIV DNA<sup>a, d</sup></b>	1198 (33-70123)	1185 (70-18856)	1297 (33-70123)	ns
<b>T<sub>1</sub> CD4 cell/mm<sup>3a</sup></b>	560 (54-1330)	580 (54-1306)	485 (96-1330)	ns
<b>T<sub>1</sub> CD4 %<sup>a</sup></b>	28.9 (3.4-55.2)	29.9 (3.4-55.2)	26 (5-51.9)	ns
<b>T<sub>1</sub> HIV RNA &lt; 2,5 copie/ml n (%)</b>	83 (37.9%)	62 (42.4%)	21 (28.7%)	ns
<b>T<sub>1</sub> HIV DNA<sup>a, d</sup></b>	107 (5-892)	105 (5-892)	110 (5-740)	ns

<sup>a</sup> Espressi come mediana e range, <sup>b</sup> Rischio di trasmissione riportato come prevalente, <sup>c</sup> Essere in infezione acuta ( Primary) all'inizio della terapia, <sup>d</sup> copie/10<sup>6</sup>PBMCs.

**Tabella 1:** Dati demografici, virologici e immunologici riportati per l'intera popolazione e per i sottogruppi R5 e X4 identificati tramite genotipizzazione al T<sub>1</sub>.

#### 4.1.2 Confronto tra il T<sub>1</sub> e il baseline (T<sub>0</sub>) del tropismo e dei parametri viro-immunologici

Per quanto riguarda lo studio retrospettivo nella coorte I delle correlazioni del tropismo X4/R5 con l'HIV-1 DNA, la conta dei CD4<sup>+</sup> e la viremia residua, è stato inizialmente valutato quali dei pazienti della coorte fossero idonei le analisi descritte anche al baseline (T<sub>0</sub>). Dopo questo processo di validazione iniziale, un sottogruppo di 109 soggetti soddisfavano i prerequisiti richiesti.

Al baseline il tropismo di questi 109 pazienti era rappresentato da 75 soggetti (69%) R5 e 34 (31%) X4. Per quanto riguarda la stabilità del genotipo, i risultati mostrano che al T<sub>1</sub>, dopo un follow up con una mediana di 36 mesi (range 12 – 72), 89 pazienti (81.6%) conservavano lo stesso tropismo virale che avevano prima di iniziare la terapia (Tabella 2); al contrario 12 (16%), che avevano virus R5 tropico al T<sub>0</sub>, effettuavano lo switch a X4, mentre 8 pazienti che avevano virus X4 effettuavano lo switch a R5 (23%).

Al baseline i pazienti con virus X4 tropico avevano una conta assoluta di CD4<sup>+</sup> più bassa di quella dei pazienti con virus R5 tropico ( $p=0.0012$ ) e più alti livelli di HIV-1 RNA plasmatico ( $p=0.0431$ ).

Durante il periodo di follow up valutato, non sono state trovate differenze tra i pazienti che avevano un virus R5 tropico o X4, o tra quelli che effettuavano o non-effettuavano lo switch; tra i pazienti che effettuavano lo switch a R5, 3 soggetti avevano un'infezione acuta (*primary infection*) all'inizio della terapia.

Per quanto riguarda i valori dell'HIV-1 DNA tra il T<sub>0</sub> e il T<sub>1</sub>, i pazienti con un virus X4 stabile mostravano una diminuzione dei livelli di DNA provirale da 516 a 58.5 copie/10<sup>6</sup> PBMCs (valore della mediana), mentre i pazienti con un virus R5 stabile mostravano una diminuzione da 896 a 127 copie/10<sup>6</sup> PBMCs. Tra i soggetti che presentano switch di tropismo a virus X4 è stata rilevata una diminuzione dei livelli di HIV-1 DNA da 1432 a 159 copie/10<sup>6</sup> PBMCs, mentre nei soggetti che passavano ad avere un virus R5 è stata rilevata una diminuzione da 419.5 a 111 copie/10<sup>6</sup> PBMCs.

I soggetti con un virus X4 stabile avevano un valore mediano di recupero di cellule CD4<sup>+</sup> di 235 (range da 185 a 420 cellule), mentre i pazienti con un virus R5 stabile mostravano un recupero di CD4<sup>+</sup> mediano di 237 cellule (range da 305 a 542). I soggetti che cambiavano tropismo virale verso X4 presentavano un recupero di CD4<sup>+</sup> mediano di 197 cellule (range da 228 a 425), mentre i pazienti che cambiavano verso R5 avevano un recupero mediano di 496 cellule (range da 104 a 600).

Infine, per quanto concerne i livelli di viremia residua al T<sub>1</sub>, i pazienti che raggiungevano valori di HIV-1 RNA inferiori a 2.5 copie/ml erano: il 42.3% (11/26) dei pazienti X4 stabili, il 46% (29/63) dei pazienti con virus R5 stabile, il 16.6% (2/12) dei soggetti che effettuavano lo switch a X4 e il 43% (3/8) di quelli che lo cambiavano in R5 ( $p=ns$ ).

	<b>R5 (T<sub>1</sub>)</b>	<b>X4 (T<sub>1</sub>)</b>	<b>Total</b>
<b>R5 (T<sub>0</sub>)</b>	63	12	75
<b>X4 (T<sub>0</sub>)</b>	8	26	34
<b>Total</b>	71	38	109

**Tabella 2:** Tropismo R5 e X4 al T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub> (Persistenza del tropismo: 82%,  $p < 0.001$ ). 89 soggetti non cambiavano il loro tropismo.

### 4.1.3 Analisi del tropismo ai tempi di follow-up T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>

Dei 219 soggetti (corte I) valutati al T<sub>1</sub>, per 86 pazienti è stato preso in considerazione un ulteriore tempo di follow up (T<sub>2</sub>), con una mediana di 16 mesi dopo il T<sub>1</sub>. per questo intervallo di tempo abbiamo preso in considerazione una seconda valutazione del tropismo di HIV-1 e dei parametri viro-immunologici.

In 57 pazienti (67%) è stato trovato un virus R5 tropico (Tabella 3). Il tropismo del virus, nell'intervallo di follow-up T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>, era stabile per 73 su 86 pazienti (84%); al T<sub>2</sub> solo 6 di 57 pazienti che avevano un virus R5 tropico al T<sub>1</sub> effettuavano uno switch a X4, mentre 7 di 29 soggetti con virus X4 cambiavano a R5. Nell'intervallo di follow-up T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i quattro gruppi di pazienti; solo 1 paziente che mutava tropismo da R5 a X4 era in primary.

Per quanto riguarda i livelli di HIV-1 RNA al T<sub>1</sub>, la capacità di raggiungere valori di *undetectability* correlava con l'assenza di switching del tropismo virale tra T<sub>1</sub> al T<sub>2</sub> ( $p = 0.0007$ ). Inoltre il fatto di avere tropismo X4 al T<sub>1</sub> correlava negativamente con la possibilità di raggiungere il successo virologico, ovvero di raggiungere livelli di viremia residua inferiore a 2.5 copie/ml al T<sub>2</sub> ( $p = 0.0076$ ). In Tabella 4 è riportata l'evoluzione del tropismo nell'intervallo di follow-up T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> e la determinazione della viremia residua inferiore a 2.5 copie/ml al T<sub>2</sub> ( $p = 0.009$ ). Tali risultati mostrano che il mantenimento dei livelli di HIV-1 RNA a meno di 2.5 copie/ml durante in periodo T<sub>1</sub> - T<sub>2</sub> si riscontrava prevalentemente nei pazienti in cui il tropismo era stabile. In particolare nei pazienti stabilmente R5, la persistenza di una viremia residua *undetectable* era il 76% ( $p = 0.002$ ) (Tabella 4).

Per quanto riguarda la terapia, non sono state trovate differenze statisticamente significative.

Andando a valutare il tropismo al T<sub>2</sub> e il recupero dei CD4<sup>+</sup>, nei pazienti R5 la media dell'aumento delle cellule CD4<sup>+</sup> da T<sub>1</sub> a T<sub>2</sub> era significativamente più alta rispetto a quelli X4 ( $p = 0.049$ ).

	R5 (T <sub>2</sub> )	X4 (T <sub>2</sub> )	Total
R5 (T <sub>1</sub> )	51	6	57
X4 (T <sub>1</sub> )	7	22	29
Total	58	28	86

**Tabella 3:** Tropismo R5 e X4 al T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> (Persistenza del tropismo: 85%.  $p < 0.001$ ). 73 soggetti non cambiano il loro tropismo.

	Tropismo X4 stabile	Tropismo R5 stabile	Switch a X4	Switch a R5
CD4 <sup>+</sup> T <sub>1</sub> <sup>a</sup> (cell/mm <sup>3</sup> )	431 (130-950)	560 (54-1170)	600 (330-860)	420 (315-890)
CD4 <sup>+</sup> T <sub>2</sub> <sup>a</sup> (cell/mm <sup>3</sup> )	520 (170-1110)	615 (92-1291)	540 (290-970)	535 (420-740)
HIV-DNA T <sub>1</sub> <sup>a</sup> (copie/10 <sup>6</sup> PBMCs)	41 (< 5-448)	95 (< 5-892)	75,5 (< 5-532)	196 (18-424)
HIV-DNA T <sub>2</sub> <sup>a</sup> (copie/10 <sup>6</sup> PBMCs)	50.5 (< 5-448)	83 (< 5-469)	31 (< 5-412)	70 (7-147)
HIV RNA < 2.5 copie/ml (n/total n pazienti) <sup>b</sup>	2/22	19/51	4/6	1/7

<sup>a</sup>Espressi come mediana e range, <sup>b</sup> Pearson  $\chi^2$  (3)=11.5664,  $p = 0.0009$

**Tabella 4:** Evoluzione dei livelli di HIV-1 DNA e conta delle cellule CD4<sup>+</sup> in 86 pazienti seguiti dal T<sub>1</sub> al T<sub>2</sub> e misura della viremia residua al T<sub>2</sub>.

	HIV RNA > 2.5 copie/ml (T <sub>2</sub> )	HIV RNA < 2.5 copie/ml (T <sub>2</sub> )	Total
HIV RNA > 2.5 copie/ml (T <sub>1</sub> )	11	2	13
HIV RNA < 2.5 copie/ml (T <sub>1</sub> )	4	5	9
<b>Total</b>	15	7	22

**Tabella 5:** Persistenza dei livelli di HIV-1 RNAa meno di 2.5 copie/ml al T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> in pazienti con tropismo R5 stabile nel tempo, espresso come numero assoluto di pazienti.

#### 4.1.4 Analisi del tropismo ai tempi di follow ups T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>

Tra gli 86 pazienti di cui abbiamo analizzato il tropismo al T<sub>2</sub>, solo per 51 soggetti è stato possibile valutare il tropismo anche al T<sub>1</sub> e al baseline (T<sub>0</sub>). Per questo sottogruppo, è stato possibile analizzare l'evoluzione del tropismo virale lungo tutto lo studio longitudinale, nel periodo di follow-up compreso da T<sub>0</sub> al T<sub>2</sub>. Il tropismo nei due periodi considerati (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>), è risultato stabile; 6 di 37 pazienti che avevano un virus R5 tropico al T<sub>0</sub>, mutavano in X4 al T<sub>2</sub> (16%); da T<sub>1</sub> a T<sub>2</sub>, 5 pazienti effettuavano lo switch a R5, e tre a X4 (8/51, 16%). Tra 8 pazienti caratterizzati da livelli di viremia residua sotto le 2.5 copie/ml al T<sub>2</sub>, e valutati per l'evoluzione del tropismo lungo i tre tempi di follow-up, 5 soggetti erano stabilmente R5, 1 era R5-R5-X4, 1 era R5-X4-R5, e 1 era X4-R5-X4 ( $p = ns$ ).

Il 24% dei pazienti che conservava stabilmente tropismo R5 lungo tutti i differenti punti dello studio longitudinale aveva meno di 2.5 copie/ml di HIV-1 RNA, a differenza di quelli con tropismo X4.

Una persistenza statisticamente significativa ( $p = 0.047$ ) del successo virologico, definito come il raggiungimento di livelli di viremia residua sotto le 2.5 copie/ml al T<sub>1</sub> e il riuscire a mantenerlo al T<sub>2</sub>, è stata osservata nei pazienti con tropismo stabile tra il T<sub>0</sub> e al T<sub>1</sub>. Complessivamente, 9 pazienti con virus R5 avevano una viremia residua sotto le 2.5 copie/ml al T<sub>1</sub> e 5 di questi hanno poi confermato questo successo virologico al T<sub>2</sub>.

Un livello di RNA sotto le 2.5 copie/ml al T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> è stato osservato in quei soggetti con tropismo R5 stabile. Il 73% dei pazienti ha mantenuto valori di viremia residua sotto le 2.5 copie/ml ( $p = 0.047$ ).

Il fatto di avere un virus X4 tropico al baseline ha mostrato correlazione con più bassi livelli di HIV-1 DNA cellulare, sia al T<sub>1</sub> ( $p = 0.0288$ ) che al T<sub>2</sub> ( $p = 0.0095$ ).



I livelli di HIV-1 DNA erano correlati con il raggiungimento del successo virologico ( $p = 0.002$ ) e ugualmente l'essere in infezione acuta all'inizio della terapia correla con una viremia residua  $< 2.5$  copie/ml ( $p = 0.008$ ).

#### 4.1.5 Verifica di qualità del saggio genotipico

Un totale di 47 pazienti avevano un *false positive rate* (FPR) tra 10-20%: 10 (9.2%) nel gruppo dei 109 pazienti valutati al T<sub>0</sub>, 24 (11%) nel gruppo dei 219 soggetti con tropismo analizzato al T<sub>1</sub> e 13 (15.1%) nel gruppo degli 86 casi studiati al T<sub>2</sub>. Complessivamente, 6 di 21 pazienti (28.6%) con FPR maggiore del 10% e 9 di 42 soggetti (21.4%) con FPR minore del 10% mutava verso R5.

#### 4.1.6 Regressione logistica multilivello

L'analisi tramite regressione logistica multilivello è stata eseguita per studiare le possibili correlazioni delle variabili in studio con il successo virologico, considerando complessivamente tutto il periodo dello studio osservazionale (coorte I). Tale analisi ha confermato che il tropismo R5 è indipendentemente correlato ( $p < 0.011$ ) con il raggiungimento di livelli di HIV-1 RNA sotto le 2.5 copie/ml (Tabella 6).

Le covariate  $\log_{10}$ DNA,  $\log_{10}$ RNA al baseline erano correlate con un esito virologico favorevole in modo statisticamente significativo.

HIV-1 RNA $< 2.5$ copie/ml	Coef.	Z	P > z	95 % CI	
Log <sub>10</sub> DNA	-1.6098	-3.21	0.001	-2.5932	-0.6263
Log <sub>10</sub> RNA al baseline	-0.6943	-2.12	0.034	-1.3359	-0.0528
X4/R5	-1.4030	-2.55	0.011	-2.4795	-0.3265
Time	-0.0072	-0.56	0.573	-0.0322	0.0178
Intercetta	6.3031	2.93	0.003	2.0913	10.5150

Log-likelihood = -143.75, Wald Test  $\chi^2 = 13.44$ ,  $p = 0.009$ .

**Tabella 6:** Persistenza dei livelli di HIV-1 RNA  $< 2.5$  copie/ml al T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> in pazienti con tropismo R5 stabile nel tempo, espresso come numero assoluto di pazienti.

## 4.2 Coorte II

### 4.1.1 Caratteristiche dei pazienti della coorte II

Nella coorte II sono state valutate le correlazioni dei livelli di HIV-1 DNA con i valori di HIV-1 RNA al baseline, della conta dei CD4<sup>+</sup> e della viremia residua. Le caratteristiche demografiche e i parametri viro-immunologici dei 181 pazienti al momento dell'arruolamento sono riportate in Tabella 7. I pazienti sono per la maggior parte maschi (76.8%), di origine italiana (80.7%), e il principale fattore di rischio nel contrarre infezione era l'abitudine sessuale (omosessuali nel 30.9% dei casi, eterosessuali nel 42.5%). I pazienti al momento dell'arruolamento avevano contratto nella maggior parte dei casi un'infezione HIV-1 cronica (87.3%) con sottotipo B (76.8%). Valori plasmatici elevati di HIV-1 RNA al T<sub>0</sub> sono stati osservati più frequentemente: a) in pazienti italiani rispetto ai soggetti di origine straniera ( $p= 0.0163$ ), b) nei maschi rispetto alle femmine ( $p= 0.0006$ ), c) in individui infettati con sottotipo B rispetto a soggetti colpiti da virus sottotipo non B ( $p= 0.0021$ ) e d) nei pazienti anziani ( $p= 0.0486$ ). Inoltre, alti livelli di HIV-1 RNA al T<sub>0</sub> sono stati correlati con un basso numero di cellule CD4<sup>+</sup> ( $p= 0.0011$ ). I pazienti che prima di iniziare la terapia erano in infezione acuta presentavano una conta delle cellule CD4<sup>+</sup> più elevata rispetto ai pazienti in infezione cronica ( $p= 0.0001$ ).

### 4.2.2 Confronto longitudinale dei parametri viro-immunologici

Nella Tabella 7 sono state riportate le caratteristiche viro-immunologiche dei 181 pazienti studiati ai tre differenti tempi di follow-up (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>); nella tabella 8 si possono osservare quelle relative al sottogruppo di 70 pazienti seguiti anche al T<sub>3</sub>. Come si può osservare da entrambe le Tabelle, considerando il baseline e tutti i punti di follow-up lungo i quali è stato condotto lo studio, l'aver un numero elevato di cellule CD4<sup>+</sup> in qualsiasi punto dello studio correlava con la probabilità di avere un recupero maggiore al follow-up successivo ( $p= 0.0001$ ).

Nella tabella 9 sono riportate le significatività delle correlazioni tra il raggiungimento della viremia residua < 2.5 cp/ml e i valori di HIV-1 RNA al baseline e i valori di HIV-1 DNA ai diversi punti di follow-up. Valori elevati di di HIV-1 RNA nel plasma al T<sub>0</sub> correlavano con alti livelli di HIV-1 DNA al T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e al T<sub>3</sub> ( $p = 0.0001$ ,  $p = 0.045$ ,  $p = 0.0055$ ,  $p = 0.0025$ , rispettivamente) ed erano negativamente correlati con la possibilità di raggiungere valori di viremia plasmatica sotto le 2.5 copie/ml al T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e al T<sub>3</sub> ( $p = 0.026$ ,  $p = 0.0149$ ,  $p = 0.0002$ , rispettivamente).

Inoltre abbiamo osservato che un valore di cut-off inferiore a 2.5 copie/ml al T<sub>2</sub> era raggiunto più frequentemente da persone che al momento di iniziare la terapia avevano meno di 100.000 copie/ml di HIV-1 RNA nel plasma rispetto a quei pazienti con più di 100.000 copie/ml ( $p= 0.007$ ).

Nelle Tabelle 8 e 9 si può anche osservare la diminuzione dei valori di HIV-1 DNA ottenuti durante il periodo dello studio. Durante i primi due anni (media, T<sub>1</sub>), è stata osservata una più veloce diminuzione dei livelli di HIV-1 DNA; successivamente, nei vari tempi di follow-up, è stata rilevata una diminuzione più lenta.

<b>Caratteristiche</b>	<b>Pazienti totali n=181</b>	<b>Infezione acuta n=23 (12.7)</b>	<b>Infezione cronica n=158 (87.3)</b>
Sesso, n (%)			
Maschi	139 (76.8)	20 (86.9)	119 (75.3)
Femmine	42 (23.2)	3 (13.1)	39 (24.7)
Età (anni)*	41 (±11.5)	38.5 (±10)	41.6 (±12)
Fattori di rischio, n (%)			
Omosessuali	56 (30.9)	11 (47.9)	45 (28.5)
Eterosessuali	77 (42.5)	9 (39.1)	68 (43)
Abuso di droghe	17 (9.3)	0	14 (8.9)
Altro	31 (17.1)	3 (13)	31 (19.6)
Sottotipo B, n (%)	138 (76.8)	21 (91.3)	118 (75)
Sottotipo Non-B, n (%)	42 (23.2)	2 (8.7)	40 (25)
Nazionalità, n (%)			
Italiani	146 (80.7)	22 (95.7)	124 (78.5)
Stranieri	35 (19.3)	1 (4.3)	34 (21.5)
CD4 <sup>+</sup> cellule/μl*	259 (±173)	412 (±210)	236 (±156)
CD4 <sup>+</sup> %	15.6 (±8.8)	23.3 (±8.6)	14.4 (±8.3)
HIV-1 DNA (copie/10 <sup>6</sup> PBMCs)*	2942 (±6468)	1915 (±2343)	3124 (±6964)
HIV-1 RNA (copie/ml)*	5.34 (±5.6)	5.34 (±5.52)	5.34 (±5.6)

\* media ± DS (deviazione standard).

**Tabella 7:** Caratteristiche demografiche e i parametri viro-immunologici dello studio II prima di iniziare la terapia HAART.

Parametri di laboratorio	T <sub>0</sub> (181 patients)	T <sub>1</sub> (181 patients)	T <sub>2</sub> (181 patients)
CD4 <sup>+</sup> cellule/ $\mu$ l*	259 ( $\pm$ 174)	563 ( $\pm$ 247)	608 ( $\pm$ 265)
CD4 <sup>+</sup> %*	15.6 ( $\pm$ 8.8)	27.6 ( $\pm$ 9.8)	29.6 ( $\pm$ 9.1)
HIV-1 DNA copie/ $10^6$ PBMCs*	2942 ( $\pm$ 6491)	256.5 ( $\pm$ 443)	141.6 ( $\pm$ 156)
HIV-1 RNA*	5.53 ( $\pm$ 6.08)	< 1.69	< 1.69
Numero di pazienti con HIV-1 RNA sotto 2,5 copie/ml	0	65 (35.9)	62 (34.2)
Tempo di follow up (mesi)*		24 $\pm$ 12	12 dopo T <sub>1</sub>

\*media  $\pm$  DS (deviazione standard)

**Tabella 8.** Evoluzione del numero e della percentuale di cellule T CD4<sup>+</sup>, dei livelli di HIV-1 DNA e del numero di pazienti con viremia residua inferiore a 2.5 copie ai tre differenti tempi di valutazione T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> di 181 pazienti.

Parametri di laboratorio	T <sub>0</sub> (70 patients)	T <sub>1</sub> (70 patients)	T <sub>2</sub> (70 patients)	T <sub>3</sub> (70 patients)
CD4 <sup>+</sup> cellule/ $\mu$ l*	255 ( $\pm$ 176)	560 ( $\pm$ 213)	600 ( $\pm$ 244)	624 ( $\pm$ 241)
CD4 <sup>+</sup> (%)*	16.4 ( $\pm$ 8.9)	29.4 ( $\pm$ 9.2)	30.3 ( $\pm$ 8.6)	31.9 ( $\pm$ 8.2)
HIV-1 DNA (copie/ $10^6$ PBMCs)*	3121 ( $\pm$ 4124)	298 ( $\pm$ 557)	167.3 ( $\pm$ 190.5)	110 ( $\pm$ 112)
HIV-1 RNA (copie/ml)*	5.57 ( $\pm$ 6.11)	< 1.69	< 1.69	< 1.69
Numero di pazienti HIV-1 RNA inferiore a 2,5 copie/ml	0	25 (35.7)	25 (35.7)	27 (38.5)
Tempi di follow-up (mesi)*		24 ( $\pm$ 12)	12 after T <sub>1</sub>	12 After T <sub>2</sub>

**Tabella 9.** Evoluzione del numero e della percentuale delle cellule T CD4<sup>+</sup>, dei livelli di HIV-1 DNA e del numero di pazienti con viremia residua inferiore a 2.5 copie/ml ai quattro differenti tempi di valutazione T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> di 70 pazienti.

Come mostrato nella Figura 4.1, la correlazione tra i valori di HIV-1 DNA e i valori di cellule CD4<sup>+</sup> ai differenti tempi di follow-up mostrava un trend lineare, nel quale livelli più alti di HIV-1 DNA ai vari punti correlava con percentili più bassi (25<sup>th</sup> e 50<sup>th</sup>) delle conte di cellule CD4<sup>+</sup> (Figura 4.2).

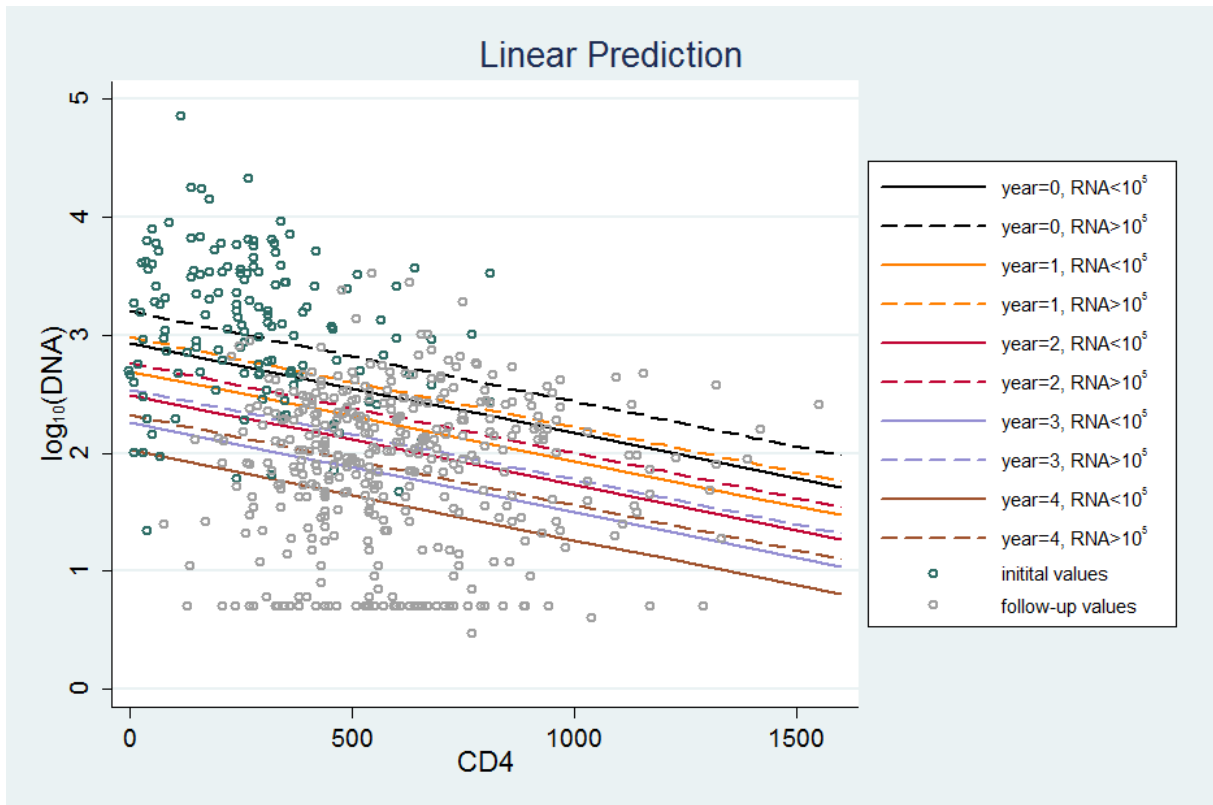


Figura 4.1 Correlazione tra i livelli di HIV DNA e la conta delle cellule CD4+ ai differenti tempi di follow up. Confronto tra i pazienti che hanno iniziato la terapia con meno di 100,000 copies/ml di HIV-1 RNA al baseline rispetto ai pazienti con più di 100,000 copies/ml.

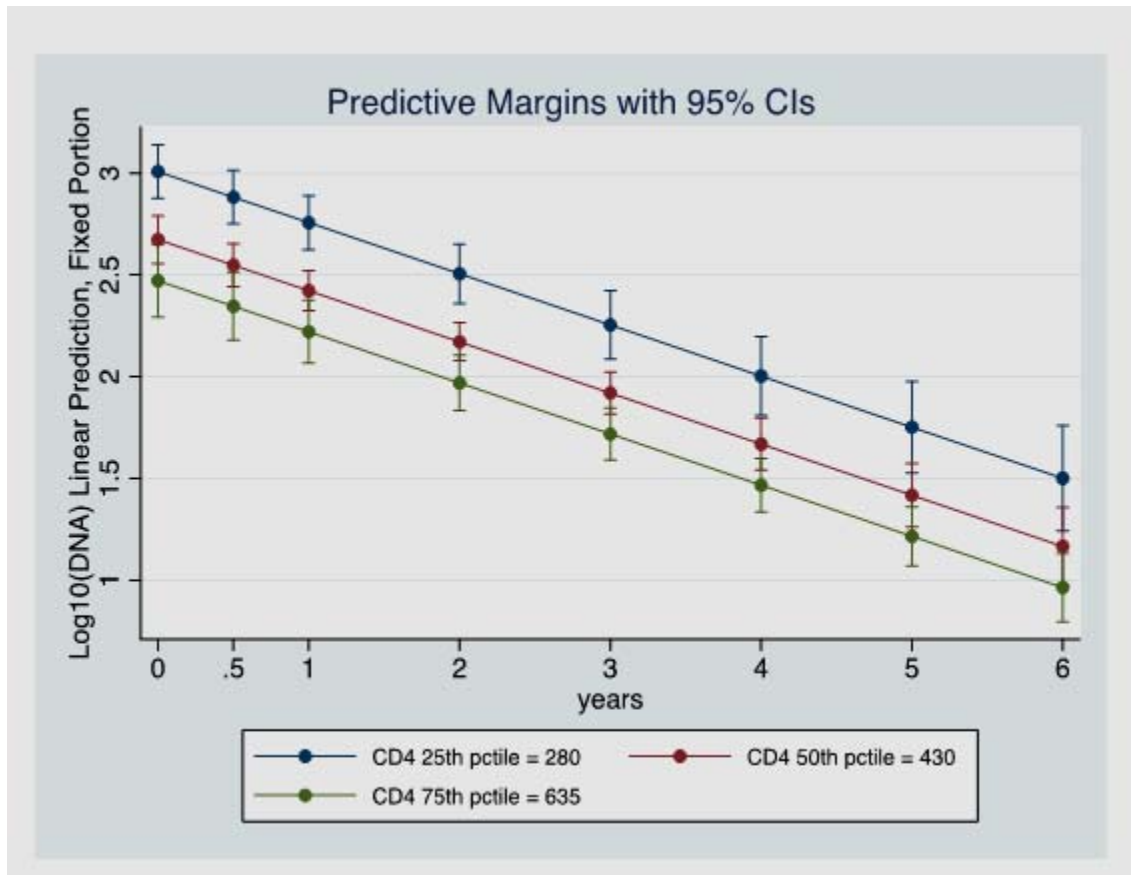


Figura 4.2 Predizione dei livelli di HIV DNA rispetto al numero delle cellule CD+ nel periodo preso in considerazione.

Nella tabella 10 si può osservare che alti livelli di HIV-1 DNA cellulare al baseline correlavano con alti valori di HIV-1 DNA al T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> ( $p = 0.0001$ ), mentre correlavano negativamente con il raggiungimento della viremia residua (< 2.5 copie/ml) a tutti e tre i tempi di follow-up ( $p = 0.0254$ ,  $p = 0.0481$ ,  $p = 0.0085$ , rispettivamente).

Avere un'infezione acuta al momento dell'inizio della terapia è stato associato con più bassa probabilità di avere alti livelli di HIV-1 DNA al T<sub>1</sub> ( $p = 0.0325$ ), al T<sub>2</sub> ( $p = 0.0254$ ) e al T<sub>3</sub> ( $p = 0.0191$ ); viceversa, essere in *primary* è stato associato sia con più alta probabilità di avere alti livelli di cellule T CD4<sup>+</sup> al baseline ( $p < 0.0001$ ), al T<sub>1</sub> ( $p = 0.0006$ ) e al T<sub>2</sub> ( $p = 0.0011$ ) che con il raggiungimento di una viremia residua inferiore a 2.5 copie/ml al T<sub>1</sub> ( $p = 0.0398$ ) e al T<sub>3</sub> ( $p = 0.0086$ ).

	HIV-1 RNA T <sub>0</sub>	HIV-1 DNA T <sub>0</sub>	HIV-1 DNA T <sub>1</sub>	HIV-1 DNA T <sub>2</sub>	HIV-1 DNA T <sub>3</sub>
HIV-1 RNA < 2,5 copie/ml al T <sub>10</sub> (68 pazienti, 37.5 %)	0.0260	0.0254	0.0001	0.0438	-
HIV-1 RNA < 2,5 copie/ml al T <sub>2</sub> (64 pazienti, 35.3%)	0.0149	0.0481	0.0154	0.0014	-
HIV-1 RNA < 2,5 copie/ml al T <sub>3</sub> (32 pazienti, 45.7%)	0.0002	0.0085	0.0088	0.0023	0.0000

\* log<sub>10</sub> copie/ml

**Tabella 10** Significatività delle correlazioni tra il raggiungimento della viraemia residua inferiore a 2.5 copie/ml al T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> e i valori di viremia plasmatica al baseline e i livelli di HIV-1 DNA al T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>.





## 5. DISCUSSIONE

### 5.1 COORTE I

Questo studio è il primo ad aver preso in considerazione le relazioni esistenti tra i livelli di HIV-1 DNA cellulare, la viremia residua inferiore a 2.5 copie/ml e il tropismo del virus archiviato, in una coorte di pazienti naive che raggiungevano e mantenevano il successo farmacologico, valutandoli al baseline ( $T_0$ ) e a due tempi di follow-up successivo. Le nostre osservazioni hanno incluso, oltre al baseline, un  $T_1$  che aveva una mediana di 36 mesi dall'inizio della terapia e, in un sottogruppo di pazienti, un  $T_2$  rappresentato da ulteriori 16 mesi dopo il  $T_1$ . Nei 109 pazienti valutati, la stabilità del tropismo al  $T_1$  rispetto al baseline era statisticamente significativa, con 89 soggetti (82%) che conservavano stabilmente il tropismo, 8 pazienti che passavano ad un tropismo R5 e 12 soggetti che passavano a X4. Tali risultati sono in accordo con quanto riportato nello studio di corte di Seclen e colleghi, i quali hanno riportato che 88% dei pazienti durante ARV avevano un tropismo stabile, a fronte di un 12 % di soggetti che effettuavano uno switch in entrambe le direzioni (Seclen et al, 2010). Soulié e colleghi hanno studiato le correlazioni tra le analisi genotipiche eseguite sul DNA e RNA in una coorte di pazienti trattati con successo per 2 anni, ed hanno osservato che il tropismo era stabile nel 92% dei soggetti; nel loro studio, lo switch del tropismo è stato dimostrato analizzando le differenze a livello genotipico sui campioni di DNA cellulare, che erano stati raccolti lungo tutto il periodo di trattamento, e sull'RNA, rilevato al tempo di viremia detectable (Soulié et al, 2011). Al contrario, nel nostro studio, lo switch del tropismo è stato valutato su campioni di DNA cellulare in pazienti trattati con terapia di successo a differenti tempi di follow-up e quindi i risultati potrebbero essere difficili da confrontare. Inoltre, come dimostrato in precedenza, i ceppi virali archiviati nel DNA possono essere diversi se confrontati con quelli nel plasma (Parisi et al, 2011). Anche nel secondo periodo in valutazione ( $T_0$ - $T_2$ ), la stabilità del tropismo rimane statisticamente significativa. In questo intervallo di follow-up, il 16% dei soggetti ha subito uno switch del tropismo, ed è stata osservata una correlazione tra lo switch a X4 e un calo del numero delle cellule  $CD4^+$ . Nei differenti gruppi non sono state osservate differenze a proposito della terapia somministrata al tempo di follow-up. La comparsa di virus X4 generalmente avviene in fase avanzata di malattia (Waters et al, 2008; Hunt et al, 2006; Schuitmaker et al, 1992), ed è associata a basse conte di cellule T  $CD4^+$ . Diversi studi hanno dimostrato una maggior prevalenza di varianti X4 in pazienti sottoposti a terapia antiretrovirale, piuttosto che in pazienti naive (Johnston et al, 2003; Delobel et al, 2005)). Delobel e colleghi suggerirono che l'emergere delle varianti X4 durante l'HAART potrebbe essere dovuto al coinvolgimento preferenziale dei reservoirs cellulari (Delobel et al, 2005). Tale coinvolgimento preferenziale può realizzarsi sia attraverso un progressivo rifornimento del pool delle cellule T  $CD4^+$  *resting* da parte di cellule che provengono dai T  $CD4^+$  *long-lived* che hanno ceppi X4 archiviati, sia attraverso la replicazione residua preferenziale dei virus X4 durante HAART. Nel nostro studio abbiamo valutato la relazione tra la replicazione selettiva degli *strain* con differente tropismo in varie condizioni

viro-immunologiche e la replicazione virale residua. In 219 pazienti trattati con successo, lungo il primo periodo di follow-up, il 38% raggiungeva un completo controllo della replicazione virale, definito come numero di copie di HIV RNA inferiore al limite di rilevazione di 2.5 cp/ml. Questo rapporto è più basso rispetto al tasso riportato in un altro studio (successo del 60%), ma paragonabile a quello ottenuto da nostre valutazioni precedenti (Parisi et al, 2012; Gianotti et al, 2012). Inoltre, è stata osservata una persistenza statisticamente significativa del raggiungimento di livelli di RNA bassi ( $p = 0.002$ ). I pazienti che avevano uno strain X4 al T<sub>1</sub> raggiungevano il successo virologico meno facilmente al T<sub>2</sub> (0.0076). Da notare che al T<sub>2</sub>, il 40% dei pazienti che avevano un virus stabilmente R5, o che lo avevano avuto precedentemente, avevano HIV RNA inferiore a 2.5 copie/ml, rispetto al 10 % dei pazienti con virus X4. A conferma di questo risultato, nel sottogruppo di 51 soggetti per cui era stata possibile una valutazione completa di tutti i parametri in studio a tutti e tre i tempi di follow up, i pazienti con virus stabilmente R5 o con tropismo R5 in almeno due delle tre determinazioni, hanno dimostrato un maggior controllo della replicazione virale plasmatica rispetto ai pazienti con virus X4. Infine, è stato osservato un tasso di successo del 24% in termini di completa soppressione della replicazione residua negli R5 stabili, mentre dei 7 soggetti con virus X4 stabile nessuno ha mostrato controllo della replicazione a livelli sotto 2.5 cp/ml e il 62% dei soggetti con livelli plasmatici di HIV RNA inferiori a 2.5 cp/ml, erano pazienti con tropismo stabilmente R5. Questi risultati ci permettono di suggerire che avere tropismo stabilmente R5 per un tempo protratto, sembra essere rilevante per il raggiungimento di un miglior controllo della viremia plasmatica. Per quanto è noto, non ci sono dati al riguardo, e quindi questa è la prima dimostrazione di una correlazione tra il genotipo R5 e un miglior controllo virologico durante il follow-up in pazienti rispondenti alla terapia.

Nella nostra coorte, dove 73 soggetti (33.4%) al T<sub>1</sub> avevano un virus X4, la conta assoluta e percentuale dei CD4<sup>+</sup> erano più alte nei soggetti R5 piuttosto che nei pazienti X4, sia al baseline che ai tempi di follow-up, mentre la conta assoluta delle cellule CD4<sup>+</sup> al T<sub>0</sub> era significativamente più alta nei pazienti R5 ( $p = 0.0216$ ). Al contrario, sia in pazienti R5 che X4 non sono state trovate differenze statisticamente significative per quanto riguarda il recupero di cellule CD4<sup>+</sup> valutati ai diversi tempi di follow-up. Questo risultato conferma i dati ottenuti in precedenza, che dimostravano come non ci siano differenze nella risposta al trattamento virologico in pazienti R5 o X4 e come vi sia uno scarso recupero di cellule CD4 sia nei pazienti X4 al baseline che in quelli che avevano subito switch da R5 a X4 (Waters et al, 2008; Delobel et al, 2005; Seclen et al, 2011; Charpentier et al, 2013). Tuttavia, nella nostra coorte, nell'intervallo T<sub>1</sub> - T<sub>2</sub>, la media della conta dei CD4<sup>+</sup> aumentava, e questo aumento era significativamente più alto in pazienti che avevano tropismo R5 piuttosto che X4 ( $p = 0.0497$ ). Questo risultato suggerisce una possibile differenza nel decorso a lungo termine di questa malattia.

Questo studio presenta alcune limitazioni. Prima di tutto, poiché il DNA virale sequenziato da PBMCs potrebbe riflettere l'HIV archiviato ai differenti stadi d'infezione, cambiamenti del tropismo virale rilevati nel nostro studio potrebbero essere causati da errori di campionamento e/o da ragioni tecniche conseguenti all'utilizzo del sequenziamento di popolazione piuttosto che lo studio delle evoluzioni delle

sottopopolazioni. Per minimizzare questi bias, abbiamo ripetuto due volte tutte le sequenze con un *false positive rate* sotto i valori di cut off. Inoltre, non è stato possibile ottenere un'analisi del tropismo per tutti i pazienti considerati ai differenti tempi di follow-up. Comunque ad ogni singolo tempo di follow-up, sono stati analizzati numerosi parametri viro-immunologici, ed è stato valutato un ampio numero di pazienti.

## 5.2 COORTE II

In questo studio sono state valutate le cinetiche di HIV-1 DNA cellulare e della viremia residua in una popolazione di pazienti naive HIV che hanno risposto alla terapia ART con livelli di HIV-1 RNA undetectable e con una media di follow-up di 4 anni: in questo modo, per ogni paziente abbiamo ottenuto una prospettiva longitudinale con diversi set-point. A tutt'oggi questo è il primo studio noto che affronta queste valutazioni. Il primo risultato è stato che i parametri correlati alla diminuzione del DNA di HIV-1 venivano mantenuti attraverso tutto il periodo di follow-up, stabilendo quindi che la correlazione tra la carica virale e la quantità di HIV-1 DNA cellulare prima dell'inizio della terapia era regolarmente mantenuta nel tempo durante la terapia di successo. Questi risultati confermano che la carica virale (HIV-1 RNA) e la quantità di HIV-1 DNA cellulare sono i principali fattori collegati alla dimensione del reservoir virale, anche dopo un lungo periodo dall'inizio della una terapia.

Un altro risultato è stato la dimostrazione che a tutti i tempi di follow-up, livelli elevati di HIV-1 DNA erano negativamente correlati con il raggiungimento della viremia residua  $< 2.5$  copie/ml. Questo risultato dimostra che la persistenza della viremia residua è correlata principalmente con la dimensione del reservoir virale piuttosto che all'attiva replicazione, e supporta l'ipotesi che la viremia residua è il risultato del rilascio virale da parte di cellule che vivono a lungo e che presentano infezione latente (Shen et al, 2008). L'ultimo risultato è stato la conferma di dati precedenti (Avettand-Fènoel et al, 2008; Parisi et al, 2012; Hocqueloux et al, 2013; Watanabe et al, 2011) riguardanti i benefici a lungo termine ottenuti se il trattamento antiretrovirale viene iniziato quando il paziente è in fase di infezione acuta. Tale evidenza è stata confermata da un migliore recupero immunologico, dalla soppressione della replicazione virale così come da una più ampia riduzione del reservoir virale nel sangue periferico, rispetto a quanto si riscontra in pazienti trattati durante la fase di infezione cronica .

La correlazione tra i livelli di HIV-1 DNA e lo stato viro-immunologico prima e dopo trattamento HAART (HIV-1 RNA al baseline, valore dei  $CD4^+$  al nadir e conta delle cellule  $CD4^+$ ) era già nota (Burgard et al, 2009; Sarmati et al, 2007). Inoltre, da nostri studi precedenti era già emerso che la diminuzione dei livelli di HIV-1 DNA durante una terapia di successo è direttamente correlata con i livelli di HIV-1 DNA e di HIV-1 RNA al baseline, all'aumento delle conte delle cellule  $CD4^+$  ed il raggiungimento della viremia residua al di sotto di 2.5 copie/ml (Parisi et al, 2012; Parisi et al, 2013; Sarmati et al, 2012). Comunque, in un recente studio trasversale nel quale sono stati valutati 243 pazienti cronici trattati con HAART, Fourati e colleghi hanno osservato che un'alta carica virale al baseline era il principale fattore associato con l'incapacità dei pazienti trattati con successo di raggiungere bassi livelli

di HIV-1 DNA dopo un lungo tempo di follow-up, e hanno riportato che non esiste correlazione tra i livelli di HIV-1 DNA, la conta al nadir o la conta delle cellule CD4<sup>+</sup> (Fourati et al, 2014). In accordo con questi dati, nel nostro studio i livelli elevati di HIV-1 RNA al baseline correlavano con alti livelli di HIV-1 DNA a tutti i tempi di follow-up, il che dimostrava una stretta correlazione tra la carica virale prima dell'inizio della terapia e la dimensione del reservoir. Rispetto al lavoro di Fourati, che valutava una popolazione trattata per 9 anni (mediana) ma che aveva livelli di HIV-1 RNA inferiori a 50 copie/ml da 3.1 anni (mediana), la nostra coorte di naive è rimasta virologicamente soppressa per tutto il periodo preso in considerazione, ovvero 4 anni dopo l'inizio di terapia.

In un recente studio di coorte monocentrico condotto da Hocqueloux e colleghi (Hocqueloux et al, 2013), il solo fattore predittivo di un recupero di cellule CD4<sup>+</sup> e del raggiungimento di una carica virale undetectable era un basso livello di HIV-1 DNA prima della terapia, confermando ancora una volta che esiste una stretta correlazione tra il reservoir virale e il recupero immunologico. I risultati di questo studio hanno confermato che esiste una stretta correlazione tra i valori di HIV-1 DNA e la conta delle cellule CD4<sup>+</sup> a tutti i tempi di follow-up e dimostrano che bassi livelli di HIV-1 DNA sono associati ad un più ampio recupero immunologico durante una terapia di successo. Inoltre, è stata osservata una correlazione inversa tra i livelli di HIV-1 DNA all'inizio della terapia ART e a tutti i successivi tempi di follow up con la possibilità di raggiungere una viremia residua < 2.5 copie/ml. Quest'ultimo risultato sottolinea come il DNA cellulare possa avere un significato prognostico per quanto riguarda il recupero immunologico e il controllo della replicazione del virus a bassi livelli. Come in precedenza riportato dal nostro e da altri gruppi (Parisi et al, 2012; Fourati et al, 2014), un basso livello di HIV-1 DNA è stato associato con l'assenza di viremia residua, suggerendo che avere un limitato pool di cellule *resting* infettate è correlato a uno stretto controllo della viremia residua. A questo riguardo, si potrebbe pensare che a livelli molto bassi di HIV-1 DNA, la quantità di virus che è rilasciata dal reservoir virale è molto bassa e che un rilascio virale più basso nel plasma potrebbe facilitare lo svuotamento del reservoir e prevenire il riempimento del reservoir del sangue periferico.

Nello studio condotto da Hocqueloux e colleghi (Hocqueloux et al, 2013), i pazienti con infezione acuta erano quelli che raggiungevano, dopo una media di 4 anni di follow-up, livelli più bassi di HIV-1 DNA e livelli più alti di linfociti CD4<sup>+</sup>. Questi autori hanno evidenziato che i livelli di HIV-1 DNA al baseline erano il solo parametro di laboratorio predittivo di una risposta immunologica ottimale. La conferma di questi risultati è stata osservata nel nostro studio che ha confrontato una coorte di pazienti in infezione acuta e cronica senza precedenti fallimenti. In accordo con i risultati riportati da Hocqueloux e colleghi, abbiamo osservato che il trattamento di pazienti durante l'infezione acuta è associato al raggiungimento di livelli più bassi di HIV-1 DNA a tutti i tempi di follow-up, con una più alta probabilità di raggiungere livelli di HIV-1 RNA < 2.5 copie/ml ai differenti tempi di follow-up. Questa correlazione potrebbe essere dovuta a una scarsa produzione di virioni da parte del reservoir che è stato ridotto da una precoce ART. La scoperta che un migliore recupero immunologico, così come una più veloce ed intensa riduzione della

carica virale, è stata osservata nei pazienti trattati durante la fase di infezione acuta avvalorando l'indicazione per un precoce trattamento dell'infezione da HIV.

La principale limitazione del nostro studio è stata la valutazione dell'HIV-1 DNA utilizzando un saggio di PCR che non permette di distinguere tra le forme di genoma virale competenti per la replicazione da quelle difettive. Per le analisi è stato possibile valutare solo l'HIV-1 DNA periferico, che è un parametro clinicamente utile e accessibile, ma che non permette di distinguere tra le forme di HIV-1 DNA integrate e non integrate, rendendo così difficile esprimere un'opinione sul valore potenzialmente prognostico dei livelli di DNA. Non siamo stati in grado di misurare i valori di virus non integrato al baseline perché ci mancava un'adeguata quantità di PBMCs stoccata al T<sub>0</sub> per questa analisi; sarebbero state necessarie approssimativamente  $6 \times 10^7$  PBMCs (Buzon et al, 2010). Questo tipo di analisi non era stata pianificata all'inizio dello studio, e i valori dei follow-up non potrebbero essere interpretati senza baseline di riferimento. Tuttavia, come riportato precedentemente (Mexas et al, 2012), l'HIV-1 DNA non integrato diventa undetectable durante il primo anno di ART, e i livelli di HIV-1 DNA integrato e quello totale sono generalmente uguali in pazienti tenuti sotto controllo da una terapia di successo.

Malgrado questa limitazione, il corrente studio suggerisce che esiste una buona e stretta correlazione a lungo termine tra la carica virale plasmatica, la conta delle cellule CD4<sup>+</sup> e l'HIV-1 DNA prima e dopo l'inizio della terapia antiretrovirale. Inoltre, la quantità di HIV-1 DNA è predittiva di recupero immunologico ed è strettamente correlato con il controllo della viremia residua  $< 2.5$  copie/ml lungo tutto il periodo di follow-up, in una coorte di pazienti naive trattati con successo.



## 6. CONCLUSIONI

In questo studio è stato osservato che nei pazienti naive trattati con successo il tropismo del virus HIV archiviato rimaneva stabile per tutta la durata dello studio longitudinale, ma con una percentuale di soggetti (15-18%) che nel tempo ha cambiato tropismo, malgrado una viremia inferiore a 50 copie/ml. In pazienti che rispondono con successo alla terapia antiretrovirale, un tropismo R5 e la sua stabilità al follow-up sono correlati con il raggiungimento e il mantenimento di livelli molto bassi di replicazione virale (meno di 2.5 copie/ml), suggerendo una relazione tra il tropismo virale e una terapia di successo a lungo termine.

Inoltre il nostro studio conferma il ruolo di HIV-1 DNA come marcatore prognostico utile nel monitorare la carica virale prima di iniziare la terapia antiretrovirale e come marcatore indice di svuotamento dei reservoirs durante terapia efficace e prolungata; inoltre sottolinea il valore addizionale che questo test potrebbe avere nella valutazione clinica complessiva di pazienti rispondenti alla terapia quando è necessario intraprendere scelte terapeutiche alternative.





## **BIBLIOGRAFIA**

**Alexaki A**, Liu Y, Wigdahl B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr HIV res*, 2008; 6:388-400.

**Alimonti JB**, Ball TB, and Fowke KR, Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS, *Journal of general virology*. 2003;84:1649–1661.

**Alkhatib G**, Combadiere C, Broder CC, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996;272:1955–1958

**Andreoni M**, Parisi SG, Sarmati L, Nicastrì E, Ercoli L, Mancino G, Sotgiu G, Mannazzu M, Trevenzoli M, Tridente G, Concia E, Aceti A. Cellular proviral HIV-DNA decline and viral isolation in naive subjects with < 5000 copies/ml of HIV-RNA and > 500 CD4 cells treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2000;14:23–29.

**Avettand-Fènoël V**, Boufassa F, Galimand J, Meyer L, Rouzioux C. HIV-1 DNA for the measurement of the HIV reservoir is predictive of disease progression in seroconverters whatever the mode of result expression is. *J Clin Virol* 2008; 42: 399-404.

**Ayoub A**, Souquieres S, Njinku B, Martin PM, Muller-Trutwin MC, Roques P, Barre-Sinoussi F, Mauclore P, Simon F, and Nerrienet E. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS* 2000;14:2623–2625.

**Berger EA**. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS* 1997; 11 (Suppl A):S3–S16.

**Bourlet T**, Pretis C, Pillet S, Lesenechal M, Piche J and Pozzetto B. Comparative evaluation of the VIDAS HIV DUO Ultra assay for combined detection of HIV-1 antigen and antibodies to HIV, BioMérieux, Marcy l’Etoile, France Available online 27 April 2005).

**Bourlet T**, Pretis C, Pillet S, Lesenechal M, Piche J, Pozzetto B. Comparative evaluation of the VIDAS HIV DUO Ultra assay for combined detection of HIV-1 antigen and antibodies to HIV. *J Virol Methods*. 2005;127:165-7.

**Buonaguro L**, Petrizzo A, Tagliamonte M, Vitone F, Re MC, Pilotti E, Casoli C, Sbreglia C, Perrella O, Tornesello ML and Buonaguro F. Molecular and phylogenetic analysis of HIV-1 variants circulating in Italy. *Infectious Agents Cancer* 2008;3:13.

**Buonaguro L**, Tornesello ML, and Buonaguro FM. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype Distribution in the Worldwide Epidemic: Pathogenetic and Therapeutic Implications, *Journal of Virology* 2007;19:10209-10219.

**Burgard M**, Boufassa F, Viard JP, Garrique I, Ruffault A, Izopet J, Vabret A, Descamps D, Colson P, Seigneurin JM, Rouzioux C; ANRS AC11 Working Group: Factors influencing peripheral blood

mononuclear cell-associated HIV-1 DNA level after long-term suppressive antiretroviral therapy in 236 patients. *AIDS* 2009;23:2165-2171.

**Butler SL**, Hansen MS, Bushman FD. A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nat Med*. 2001;7:631-634.

**Buzón MJ**, Massanella M, Llibre JM et al. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART suppressed subjects. *Nat Med* 2010;16: 460-465.

**Carr A**. Lactic acidemia in infection with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2003:S96-100.

**Chalmet K**, Dauwe K, Foquet L, et al. Presence of CXCR4-using HIV-1 in patients with recently diagnosed infection: correlates and evidence for transmission. *J Infect Dis* 2012;205:174–184.

**Charpentier C**, Landman R, Laouénan C, Joly V, Hamet G, Damond F, Brun-Vézinet F, Mentré F, Descamps D, Yeni P. Persistent low-level HIV-1 RNA between 20 and 50 copies/mL in antiretroviral-treated patients: associated factors and virological outcome. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:2231-5.

**Chawla A**, Murphy G, Donnelly C, Booth CL, Johnson M, Parry JV, Philips A, Geretti M. Human Immunodeficiency Virus (HIV) antibody avidity testing to identify recent infection in newly diagnosed HIV type 1 (HIV-1)-seropositive persons infected with diverse HIV-1 subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007;45:415-420.

**Chevret S**, Kirstetter M, Mariotti M, Lefrère F, Frottier J, Lefrère JJ. Provirus copy number to predict disease progression in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal of infectious diseases* 1994;169:882-885.

**Chomont N**, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel MR, Ghattas G, Brenchley JM, Schacker TW, Hill BJ, Douek DC, Routy JP, Haddad EK, Sékaly RP. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature medicine*, 2009;15:893-900.

**Chun TW**, Justement JS, Lempicki RA. Gene expression and viral production in latently infected, resting CD4+ T cells in viremic versus aviremic HIV-infected individuals. *Prot Natl Acad Sci*, 2003;100:1908-1913.

**Chun TW**, Murray D, Justement JS, Hallahan CW, Moir S, Kovacs C, and Fauci AS. Relationship Between Residual Plasma Viremia And The Size Of HIV Proviral DNA Reservoirs in Infected Individuals Receiving effective antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2011;204:135-8.

**Chun TW**, Nickle DC, Justement JS, Large D, Semerjian A, Curlin ME, O'Shea MA, Hallahan CW, Daucher M, Ward DJ, Moir S, Mullins JI, Kovacs C, Fauci AS, HIV-1 infected individuals receiving highly active antiretroviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *J Clin Invest*, 2005;115:3250-3255.

**Chun TW**, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA, Fauci AS. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94:13193-13197.

**Clavel F**, Guyader M, Guétard D, Sallé M, Montagnier L, Alizon M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature.* 1986;324:691-5.

**Clevestig P**, Pramanik L, Leitner T, Ehrnst A. CCR5 use by human immunodeficiency virus type 1 is associated closely with the gp120 V3 loop N-linked glycosylation site. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 3):607-12.

**Coffin JM**, Hughes SH, Varmus HE. *Retroviruses.* Eds Cold Spring Harbor Laboratory Press Publ, Cold Spring Harbor (NY; USA), 1997

**Cooper DA**, Gold J, Maclean P et.al. : Acute AIDS retrovirus infection. Definition of clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1985;1:537-540

**Corzillius M**, Muhlberger N, Sroczynski G, Jaeger H, Wasem J, Siebert U. Cost effectiveness analysis of routine use of genotypic antiretroviral resistance testing after failure of antiretroviral treatment for HIV. *Antivir Ther.* 2004;9:27-36.

**D'Ettore G**, Zaffiri L, Ceccarelli G, Mastroianni CM, Vullo V. The role of HIV-DNA testing in clinical practice. *New Microbiologica* 2010;33:1-11.

**Davey RT**, Bhat N, Yoder C, Chun T, Metcalf TW, Dewar R, Natarajan V, Lempicki RA, Adelsberger JW, Miller KD, Fauci AS, Lane HC, HIV-1 and T cells dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci*, 1999;96:15109-15114.

**Davis C**, Heath A, Best S, et al. Calibration of HIV-1 working reagents for nucleic acid amplification techniques against the 1st international standard for HIV-1 RNA. *J Virol Meth* 2003;107:37-44.

**De Angelis DS**, Freire WS, Pannuti CS, Succi RC, Machado DM. CCR5 genotypes and progression to HIV disease in perinatally infected children. *The Brazilian Journal of infectious diseases* 2007;11(2):196-198.

**De Leys R**, Vanderborcht B, Haeseveide MV and al. Isolation and Partial Characterization of an Unusual Human Immunodeficiency Retrovirus from Two Persons of West-Central African Origin. *Journal of Virology.* 1990;1207-1216.

**De Luca A**. HIV-1 co-receptor tropism evolution in naive patients undergoing successful ART: concordance of DNA vs. RNA and triplicate versus singlicate population sequencing. *Rev Antivir Ther Infect Dis.* Barcelona; 2012

**De Rossi A**, Zanchetta M, Vitone F, Antonelli G, Bagnarelli P, Buonaguro L, Capobianchi MR, Clementi M, Abbate I, Canducci F, Monachetti A, Riva E, Rozera G, Scagnolari C, Tagliamonte M, Re MC;

SIVIM (Italian Society of Medical Virology) Group. Quantitative HIV-1 proviral DNA detection: a multicentre analysis. *New Microbiol.* 2010 Oct;33:293-302.

**Deeks SG**, Smith M, Holodniy M, Kahn JO. HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians. *JAMA.* 1997 8;277:145-53.

**Delobel P**, Sandres-Sauné K, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, Izopet J: R5 to X4 switch of the predominant HIV-1 population in cellular reservoirs during effective highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;38:382–392.

**Douek DC**, Brenchley JM, Betts MR, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature.* 2002;417:95–8

**Doyle T**, Geretti AM. Low-level viremia on HAART: significance and management. *Curr Opin Infect Dis* 2012;25:17-25.

**Dryden CA** and Silvestri G. Viral and Host Factors in the Pathogenesis of HIV Infection, *Current Opinion in Immunology* 2005;366–373.

**Dunfee RL**, Thomas ER, Wang J, et al. Loss of the N-linked glycosylation site at position 386 in the HIV envelope V4 region enhances macrophage tropism and is associated with dementia. *Virology.* 2007;367:222–34

**Durante AJ**, Bova CA, Fennie KP, Danvers KA, Holness DR, Burgess JD, Williams AB. Home-based study of anti-HIV drug regimen adherence among HIV-infected women: feasibility and preliminary results. *AIDS Care.* 2003;15:103-15.

**Fenyo EM**, Albert J, Asjo B. Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism of HIV. *AIDS* 1989; 3:S5–S12

**Fenyo EM**, Fiore J, Karlsson A, et al. Biological phenotypes of HIV-1 in pathogenesis and transmission. *Antibiot Chemother* 1994;46:18–24

**Fiebig EW**, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, Heldebrant C, Smith R, Conrad A, Kleinman SH, Busch MP. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 2003;17:1871-9.

**Finzi D**, Hermanokva M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson C, Quinn RE, Chadwick K, Margolik J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF, 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, 1997;278:1295-1300.

**Fouchier RA**, Groenink M, Kootstra NA, et al. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* 1992;66:3183–3187.

**Fourati S**, Flandre P, Calin R et al. Factors associated with a low HIV reservoir in patients with prolonged suppressive antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 753-756.

**Frange P**, Galimand J, Goujard C, Deveau C, Ghosn J, Rouzioux C, Meyer L, Chaix ML. High frequency of X4/DM-tropic viruses in PBMC samples from patients with primary HIV-1 subtype-B infection in 1996-2007: the French ANRS CO06 PRIMO Cohort Study. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:135-41.

**Freed EO**: HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics* 2001; 26:13-33

**Gallo RC**, Montagnier L . La scoperta dell'HIV come causa dell'AIDS. *N Engl J Med.* 2003; 349:2283-5.

**Gao F**, Vidal N, Li Y, Trask SA, Chen Y, Kostrikis LG, Ho DD, Kim J, M, Oh MD, Choe K, Salminen M, Robertson DL, Shaw GM, Hahn BH, and Peeters M. Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 2001;17:675–688.

**Gianotti N**, Galli L, Racca S, Sampietro S, Cossarini F, Spagnolo V, Barda B, Canducci F, Clementi M, Lazzarin A, Castagna A. Residual viraemia does not influence 1 year virological rebound in HIV-infected patients with HIV RNA persistently below 50 copies/mL. *J Antimicrob Chemother*, 2012;67:213-217.

**Gomez C** and Hope TJ.. The ins and outs of HIV replication. *Cell. Microbiol.* 2005;7,621-626.

**Goujard C**, Bonarek M, Meyer L, Bonnet F, Chaix ML, Deveau C, Sinet M, Galimand J, Delfraissy JF, Venet A, Rouzioux C, Morlat P. CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. *Clinical Infectious Disease*, 2006;42:709-15.

**Grady C**, Vogel S. Laboratory methods for diagnosing and monitoring HIV infection. *J Assoc Nurses AIDS Care.*1993;4:11-21.

**Gurunathan S**, Habib RE, Baglyos L, Méric C, Plotkin S, Dodet B, Corey L, Tartaglia J. Use of predictive markers of HIV disease progression in vaccine trials. *Vaccine.* 2009;27:1997-2015.

**Guttman M**, Kahn M, Garcia NK, Hu SL, Lee KK. Solution structure, conformational dynamics, and CD4-induced activation in full-length, glycosylated, monomeric HIV gp120. *J Virol.* 2012 Aug;86:8750-64.

**Hamers FF**, Phillips AN. Diagnosed and undiagnosed HIV-infected populations in Europe. *HIV Med* 2008;9:6-12.

**Harrison**, Kasper, Braunwald, Fauci, Hase, Longo, Jameson. *Pincipi di medicina interna*, 16° edizione, eds McGraw-Hill, 2005;1234.

**Haubrich RH**, Riddler SA, Ribaldo H, Drenzo G, Klingman KL, Garren KW, Butcher DL, Rooney JF, Havlir DV, Mellors JW; AIDS Clinical Trials Group (ACTG) A5160 and A5142 Study Teams. Initial viral decay to assess the relative antiretroviral potency of protease inhibitor-sparing, nonnucleoside

reverse transcriptase inhibitor-sparing, and nucleoside reverse transcriptase inhibitor-sparing regimens for first-line therapy of HIV infection. *AIDS*. 2011;25:2269-78.

**Hemelaar J**, Gouws E, Ghys PD, and Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006;20:W13–W23.

**Hirsch MS**, Brun-Vezinet F, D’Aquila RT, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection. Recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2000; 283: 2417-2426.

**Hocqueloux L**, Avettand-Fènoël V, Jacquot S et al. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 1169-1178.

**Hogg RS**, Yip B, Chan KJ, et al. Rates of disease progression by baseline CD4 cell count and viral load after initiating triple-drug therapy. *J Am Med Assoc* 2001;286:2568–2577.

**Huang W**, Toma J, Fransen S, et al. Coreceptor tropism can be influenced by amino acid substitutions in the gp41 transmembrane subunit of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol*. 2008;82:5584–93

**Hunt PW**, Cao HL, Muzoore C, Sewanyana I, Bennett J, Emenyonu N, Kembabazi A, Neilands TB, Bangsberg D, Deeks SG, Martin JN. Impact of CD8+ T-cell activation on CD4+ T-cell recovery and mortality in HIV-infected Ugandans initiating antiretroviral therapy. *AIDS*.2011 Nov;25:2123-31.

**Hunt PW**, Harrigan R, Huang W, Bates M, Williamson DW, McCune JM, Price RW, Spudich SS, Lampiris H, Hoh R, Leigler T, Martin JN, Deeks SG: Prevalence of CXCR4 tropism among antiretroviral-treated HIV-1infected patients with detectable viremia. *J Infect Dis* 2006;194:926–930.

**Johnston ER**, Zijenah LS, Mutetwa S, Kantor R, Kittinunvorakoon C, Katzenstein DA: High frequency of syncytium-inducing and CXCR4-tropic viruses among HIV type 1 subtype C-infected patients receiving antiretroviral treatment. *J Virol* 2003;77:7682–7688.

**Karasi JC**, Dziezuk F, Quennery L, Förster S, Reischl U, Colucci G, Schoener D, Seguin-Devaux C, Schmit JC. High correlation between the Roche COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 and the Abbott m2000 RealTime HIV-1 assays for quantification of viral load in HIV-1 B and non-B subtypes. *J Clin Virol*. 2011;52:181-6

**Karlsson A**, Parsmyr K, Aperia K, et al. MT-2 cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 isolates as a marker for response to treatment and development of drug resistance. *J Infect Dis* 1994; 170:1367-1375.

**Karlsson A**, Parsmyr K, Aperia K, et al. MT-2 cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 isolates as a marker for response to treatment and development of drug resistance. *J Infect Dis* 1994; 170:1367–1375

- Kostrikis LG**, Touloumi G, Karanicolas R, Pantazis N, Anastassopoulou C, Karafoulidou A, Goedert JJ, Hatzakis A. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA forms with the second template switch in peripheral blood cells predicts disease progression independently of plasma RNA load. *J Virol.* 2002;76:10099-100108.
- Kulkosky J**, Bray S. HAART-persistent HIV-1 latent reservoirs: their origin, their mechanisms of stability and potential strategies for eradication. *Curr HIV Res*, 2006;4:199-208.
- Langford D**, Marquie-Beck J, De Almeida S, Lazzaretto D, Letendre S, Grant I, McCutchan JA, Masliah E, Ellis RJ, 2006. Relationship of antiretroviral treatment to postmortem brain tissue viral load in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Neuro Virol*, 2006;12:100- 108.
- Ledergerber B**, Lundgren JD, Walker AS, Sabin C, Justice A, Reiss P, Mussini C, Wit F, d'Arminio Monforte A, Weber R, Fusco G, Staszewski S, Law M, Hogg R, Lampe F, Gill MJ, Castelli F, Phillips AN; PLATO Collaboration. Predictors of trend in CD4-positive T-cell count and mortality among HIV-1-infected individuals with virological failure to all three antiretroviral-drug classes. *Lancet.* 2004; 364(9428):51-62.
- Leitner T**, Kumar S, Albert J. Tempo and mode of nucleotide substitutions in gag and env gene fragments in human immunodeficiency virus type 1 populations with a known transmission history. *J Virol.* 1997;71:4761–70
- Li Q**, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, Reilly C, Carlis J, Miller CJ, Haase AT. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature*, 2005; 434: 1148-1152.
- Li S**, Juarez J, Alali M, et al. Persistent CCR5 utilization and enhanced macrophage tropism by primary blood human immunodeficiency virus type 1 isolates from advanced stages of disease and comparison to tissue-derived isolates. *J Virol.* 1999;73:9741–55
- Little SJ**, McLean AR, Spina CA, Richman DD, Havlir DV. Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med.* 1999;190:841-50.
- M. Von Sydow**, H. Gaines, A. Sonnerborg et al. Antigen detection in primary HIV infection. *British Medical Journal.* 1988;23:238-240.
- Maggiolo F**, Airoldi M, Callegaro A, Martinelli C, Dolara A, Bini T, Gregis G, Quinzan G, Suter F. Effect of prolonged discontinuation of successful antiretroviral therapy on CD T cells: a controlled prospective trials. *AIDS*, 2004;18:439-446.
- Mahieux R**, Gessain A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. *Pathologie-biologie* 2009;57:161-166.

**Masur H**, Kaplan JE et Al. Guidelines for preventing opportunistic infection among HIV infected person. Recommendations of the U.S. public health service and the Infectious diseases society of America. *Ann Intern Med* 2002;137:435-477.

**McDermott JL**, Giri AA, Martini A, Bono M, Giacomini M, Campelli A, Tagliaferro L, Cara A, Varnier OE, 1999. Level of human immunodeficiency virus DNA in peripheral blood mononuclear cells correlates with efficacy of antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol*, 37:2361-2365.

**Mellors JW**, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 1996;272(5265):1167-70. Erratum in: *Science* 1997; 275:14.

**Mexas AM**, Graf EH, Pace MJ et al. Concurrent Measures Of Total And Integrated HIV DNA Monitor Reservoirs And Ongoing Replication In Eradication Trials. *AIDS* 2012; 26: 2295-2306.

**Miedouge M**, Grèze M, Bailly A, Izopet J. Analytical sensitivity of four HIV combined antigen/antibody assays using the p24 WHO standard. *J Clin Virol*. 2011; 50:57-60.

**Milich L**, Margolin BH, Swanstrom R. Patterns of amino acid variability in NSI-like and SI-like V3 sequences and a linked change in the CD4-binding domain of the HIV-1 Env protein. *Virology*. 1997;239:108–18

**Montavon C**, Toure-Kane C, Lieggeois F, Mpoudi E, Bourgeois A, Vergne L, Perret JL, Boumah A, Saman E, Mboup S, Delaporte E, and Peeters M. Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 2000; 23:363–374.

**Moroni M**, Lazzarin A, Uberti Foppa C, Balotta C: Infezione da HIV e sindrome da immunodeficienza acquisita. In: *Malattie Infettive*, 7° edizione, Moroni M, Esposito R, De Lalla F. eds Elsevier Masson Publ, 2008;835-889.

**Motomura K**, Kusagawa S, Kato K, Nohtomi K, Lwin HH, Tun KM, Thwe M, Oo KY, Lwin S, Kyaw O, Zaw M, Nagai Y, and Takebe Y. Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in central Myanmar. *AIDS Res. Hum. Retrovir*. 2000;17:1831–1843.

**Muller V**, Viguera-Gomez JF, Bonhoeffer S. Decelerating decay of latently infected cells during prolonged therapy for human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virology* 2002;75:4091-4102.

**Murray PR**, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Retrovirus. Microbiologia*, 2° edizione, Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS and Pfaller MA, eds EdiSES Publ 2007;590-607.

**Myers G**, Korber B, Wain-Hobson S, et al. *Human retroviruses and AIDS 1994: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics (T10). Los Alamos, New Mexico:1994.



**Naif HM**, Li S, Alali M, et al. CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 1998;72:830–6

**Ngo-Giang-Huong N**, Deveau C, Da Silva I, Pellegrin I, Venet A, Harzic M, Sinet M, Delfraissy JF, Meyer L, Goujard C, Rouzioux C; French PRIMO Cohort Study Group: Proviral HIV-1 DNA in subjects followed since primary HIV-1 infection who suppress plasma viral load after one year of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001;15: 665-673.

**Nicastri E**, Palmisano L, Sarmati L, D'Ettoire G, Parisi S, Andreotti M, Buonomini A, Pirillo FM, Narciso P, Bellagamba R, Vullo V, Montano M, Di Perri G, Andreoni M. HIV-1 residual viremia and proviral DNA in patients with suppressed plasma viral load (< 400 HIV-RNA cp/ml) during different antiretroviral regimens. *Curr. HIV Res*. 2008;6:261–266.

**Noë A**, Plum J, Verhofstede C. The latent HIV reservoir in patients undergoing HAART : an archive of pre-HAART drug resistance. *J Antimicrob Chemother*, 2005;55:410-412.

**Oberlin E**, Amara A, Bachelier F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996;382:833–835.

**Ostrowski MA**, Chun TW, Justement SJ. Both memory and CD45RA+/CD262L+ naive CD4+ T cells are infected in human immunodeficiency virus type 1- infected individuals. *J virol*, 1999;73:6430-6435.

**Palmer S**, Alaeus A, Albert J, Cox S, 1998. Drug susceptibility of subtypes A, B, C, D and E human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses*.1998;14:157-162.

**Palmer S**, Maldarelli F, Wiegand A, Bernstein B, Hanna GJ, Brun SC, Kempf DJ, Mellors JW, Coffin JM, King MS. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2008;105:3879 –3884.

**Pantaleo G**, Graziosi C, Fauci AS. The immunopathogenesis of human deficiency virus infection. *N. Engl. J Med*. 1993;328:327-335.

**Paolucci S**, Baldanti F, Campanini G, Zavattoni M, Cattaneo E, Dossena L, Gerna G. Analysis of HIV drug-resistant quaspecies in plasma, peripheral blood mononuclear cells and viral isolates from treatment-naïve and HAART patients. *J Med Virol*, 2001;65:207-217.

**Parisi SG**, Andreis S, Mengoli C, Scaggiante R, Ferretto R, Manfrin V, Cruciani M, Giobbia M, Boldrin C, Basso M, Andreoni M, Palù G, Sarmati L. Baseline cellular HIV DNA load predicts HIV DNA decline and residual HIV plasma levels during effective antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2012;50:258–263.

**Parisi SG**, Andreoni C, Sarmati L, Boldrin C, Buonomini AR, Andreis S, Scaggiante R, Cruciani M, Bosco O, Manfrin V, D'Ettoire G, Mengoli C, Vullo V, Palù G, Andreoni M: HIV coreceptor tropism in paired plasma, peripheral blood mononuclear cell and cerebrospinal fluid isolates from antiretroviral naïve subjects. *J Clin Microbiol* 2011;49:1441–1445.

**Parisi SG**, Boldrin C, Cruciani M, Nicolini G, Cerbaro I, Manfrin V, Dal Bello F, Franchin E, Franzetti M, Rossi MC, Cattelan AM, Romano L, Zazzi M, Andreoni M, Palù G. Both human immunodeficiency virus cellular DNA sequencing and plasma RNA sequencing are useful for detection of drug resistance mutations in blood samples from antiretroviral drug-naive patients. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45:1783–1788.

**Pauza CD**, Trivedi P, Mckechnie TS, Richman D, Graziano FM. 2-LTR circular viral DNA as a marker for human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo. *virology.* 1994;205, 470-478.

**Raimondo M**, Camoni L, Regine V, Salfa MC, Dorrucchi M, Pugliese L, Boros S, Suligoi B. Caratteristiche delle persone che vivono con l’HIV e con l’AIDS in Italia. *Not Ist Super Sanità* 2013;26:3-6.

**Ravanshad M**, Sabahi F, Mahboudi F, Kazemnejad A. Evaluation of a new dot blot assay for confirmation of human immunodeficiency virus type 1 and 2 infections using recombinant p24, gp41, gp120 and gp36 antigens. *Saudi Med J.* 2006;27:31-6.

**Re MC**, Vitone F, Bon I, Schiavone P, Gibellini D,. Meaning of DNA detection during the follow up of HIV-1 infected patients: a brief review. *New Microbiol* 2006;29:81-88.

**Robinson HL**, Zinkus DM (1990). Accumulation of human immunodeficiency virus type 1 DNA in T cells: results of multiple infection events. *J. Virol.* 1990;64:4836-4841.

**Rockstroh JK**, Mauss S. Clinical perspective of fusion inhibitors for treatment of HIV. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:700-7002.

**Rouzioux C**, Hubert JB, Burgard M, Deveau C, Goujard C, Bary M, Séréni D, Viard JP, Delfraissy JF, Meyer L; SEROCO Cohort Study Group. Early levels of HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells are predictive of disease progression independently of HIV-1 RNA levels and CD4+ T cell counts. *J Infect Dis.* 2005;192:46-55.

**Rozera G**, Abbate I, Bruselles A, Bartolini B, D’Offizi G, Nicastrì E, Tommasi C, Capobianchi MR. Comparison of real-time PCR methods for measurement of HIV-1 proviral DNA. *J Virol Methods.* 2010 Mar;164:135-8.

**Sakai K**, Ma XY, Volsky DJ. Low-cytopathic infectious clone of human immunodeficiency virus type-I (HIV-I). *FEBS Lett* 1988;238:257–261

**Sandler NG**, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, Pedersen C, Ruxrungtham K, Lewin SR, Emery S, Neaton JD, Brenchley JM, Deeks SG, Sereti I, Douek DC, and Group ISS. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis* 2011; 203:780-790. Kuller LH, Tracy R, Belloso W, De Wit S, Drummond F, Lane HC, Ledergerber B, Lundgren J, Neuhaus J, Nixon D, Paton NI, Neaton JD, and I. S. S. Group. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med* 2008; 5:e203.

**Santoro MM**, Perno CF. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *ISRN Microbiol.* 2013; 17;2013:481314.

**Santoro MM**, Fabeni L, Armenia D, Alteri C, Di Pinto D, Forbici F, Bertoli A, Di Carlo D, Gori C, Carta S, Fedele V, D'Arrigo R, Berno G, Ammassari A, Pinnetti C, Nicastrì E, Latini A, Tommasi C, Boumis E, Petrosillo N, D'Offizi G, Andreoni M, Ceccherini-Silberstein F, Antinori A, Perno CF. Reliability and clinical relevance of the HIV-1 drug resistance test in patients with low viremia levels. *Clin Infect Dis.* 2014; 58:1156-64.

**Sarmati L**, Parisi SG, Andreoni C, Nicastrì E, Buonomini AR, Boldrin C, Dorì L, Montano M, Tommasi C, Andreis S, Vullo V, Palù G, Andreoni M: Switching of inferred tropism caused by HIV during interruption of antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2010;48:2586–2588.

**Sarmati L**, Parisi SG, Nicastrì E, d'Ettorre G, Andreoni C, Dorì L, Gatti F, Montano M, Buonomini AR, Boldrin C, Palù G, Vullo V, Andreoni M. Cellular HIV-1 DNA quantitation in patients during simplification therapy with protease inhibitor-sparing regimens. *J Med Virol.* 2007;79:880-6.

**Sarmati L**, Parisi SG, Nicastrì E, d'Ettorre G, Palmisano L, Andreotti M, Andreoni C, Giuliano M, Gatti F, Boldrin C, Palù G, Vullo V, Vella S, Andreoni M. 2005. Association between cellular human immunodeficiency virus DNA level and immunological parameters in patients with undetectable plasma viremia level during highly active antiretroviral therapy. *J. Clin. Microbiol.* 43:6183– 6185.

**Sauné K**, Delaugerre C, Raymond S, Nicot F, Boineau J, Pasquier C, Izopet J. Analytical sensitivity of three real-time PCR assays for measuring subtype B HIV-1 RNA. *J Clin Virol.* 2013;57:80-

**Sax PE**, Islam R, Walensky RP, Losina E, Weinstein MC, Goldie SJ, Sadownik SN, Freedberg KA. Should resistance testing be performed for treatment-naive HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis.* 2005;41:1316-23.

**Schuitemaker H**, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, Schattenkerk JK, Miedema F, Tersmette M: Biological phenotype of HIV type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992;66:1354–1360.

**Seclén E**, Del Mar González M, De Mendoza C, Soriano V, Poveda E: Dynamics of HIV tropism under suppressive antiretroviral therapy: implications for tropism testing in subjects with undetectable viraemia.

**Seclén E**, Soriano V, González MM, Martín-Carbonero L, Gellermann H, Distel M, Kadus W, Poveda E: Impact of baseline HIV-1 tropism on viral response and CD4 cell count gains in HIV-infected patients receiving first-line antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2011;204:139–144.

**Shen L**, Siliciano RF. Viral reservoirs, residual viremia, and the potential of highly active antiretroviral therapy to eradicate HIV infection. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 22-28.

**Shepherd JC**, Jacobson LP, Qiao W, et al. Emergence and persistence of CXCR4-tropic HIV-1 in a population of men from the Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis* 2008;198:1104–1112

**Shiramizu B**, Paul R, Williams A, Shikuma C, Watters M, Grove J, Valcour V, 2007. HIV proviral DNA associated with decreased neuropsychological function. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 2007;19:157-163.

**Shiramizu B**, Williams AE, Shikuma C, Valcour V, 2009. Amount of HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells is proportional to severity of HIV-1 associated neurocognitive disorders. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 2009;21:68-74.

**Silvestri G** and Feinberg MB. Turnover of Lymphocytes and Conceptual Paradigms in HIV Infection, *Journal of clinical investigation* 2003;821–824.

**Sonza S**, Mutimer HP, Oelrichs R, et al. Monocytes harbour replication-competent, non-latent HIV1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2001;15:17–22

**Soulie C**, Lambert-Niclot S, Wirden M, Simon A, Valantin MA, Fourati S, Tubiana R, Katlama C, Calvez V, Marcelin AG: Low frequency of HIV-1 tropism evolution in patients successfully treated for at least 2 years. *AIDS* 2011;25:537–539.

**Steighbigel RT**, Cooper DA, Kumar PN, Eron JE, Schechter M, Markowitz M, Loutfy MR, Lennox JL, Gatell JM, Rockstroh JK, Katlama C, Yeni P, Lazzarin A, Clotet B, Zhao J, Chen J, Ryan DM, Rhodes RR, Killar JA, Gilde LR, Strohmaier KM, Meibohm AR, Miller MD, Hazuda DJ, Nessler ML, DiNubile MJ, Isaacs RD, Nguyen BY, Teppler H; BENCHMRK Study Teams. Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 2008;359:339-54.

**Suligoi B**, Massi M, Galli C, Sciandra M, Di Sora F, Pezzotti P, Recchia O, Montella F, Sinicco F, Rezza G, Identifying recent HIV infections using the Avidità Index and Automated Enzyme Immunoassay. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2003; 32:424-428.

**Suligoi B**, Rodella A, Raimondo M, Regine V, Terlenghi L, Manca N, Casari S, Camoni L, Salfà MC and Galli C, 2011. Avidity index for Anti-HIV Antibodies: comparison between Third- and Fourth-Generation Automated Immunoassays. *Journal of Clinical Microbiology*; 2011; 49:2610-2613.

**Swenson LC**, Mo T, Dong WW, Zhong X, Woods CK, Jensen MA, Thielen A, Chapman D, Lewis M, James I, Heera J, Valdez H, Harrigan PR. Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients. *J Infect Dis*. 2011 Jan 15;203(2):237-45.

**Symons J**, Vandekerckhove L, Paredes R, et al. Impact of triplicate testing on HIV genotypic tropism prediction in routine clinical practice. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:606–612

**Tambussi G**, Tassandin C, Lazzarin A. Infezione acuta da HIV. In: *AIDS in Italia 20 anni dopo*. Dianzani F, Ippolito G, Moroni M eds, Masson Publ, Milano, 2004;249-255.

**Tebas P**, Henry WK, Matining R, Weng-Cherng D, Schmitz J, Valdez H, Jahed N, Myers L, Powderly WG, Katzenstein D. Effect of prolonged discontinuation of successful antiretroviral therapy on CD4+ T cells decline in human immunodeficiency virus-infected patients: implications for intermittent therapeutic strategies. *J Infect Dis*, 2002;186:851-854.

**Teo I**, Veryard C., Barnes H., An SF, Jones M., Lantos PL, Luthert P., Shaunak S. Circular forms of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA and high levels of viral protein expression: association with dementia and multinucleated giant cells in the brains of patients with AIDS. *J Virol*. 1997; 71:2928-2933.

**Thompson MA**, Aberg JA, Cahn P. Antiretroviral treatment of adult HIV infection. 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *J Am Med Assoc*. 2010; 304:321–333.

**Vandekerckhove L**, Verhofstede C, Vogelaers D. Maraviroc: integration of a new antiretroviral drug into clinical practice. *J antimicrob Chemother*, 2008;61:1187-1190.

**Varthakavi V**, Smith RM, Bour SP, Strebel K, and Spearman P. Viral Protein U Counteracts a Human Host Cell Restriction that Inhibits HIV-1 Particle Production, *PNAS* 2003;25:15154–15159.

**Verhofstede C**, Brudney D, Reynaerts J, Vaira D, Fransen K, De Bel A, Seguin-Devaux C, De Wit S, Vandekerckhove L, Geretti AM. Concordance between HIV-1 genotypic coreceptor tropism predictions based on plasma RNA and proviral DNA. *HIV Med*. 2011;12:544-52

**Verhofstede C**, Reniers S, Van Wanzele F, Plum J Evaluation of proviral copy number and plasma RNA level as early indicators of progression in HIV-1 infection: correlation with virological and immunological markers of disease. *AIDS* 1994; 8:1421-1427.

**Viard JP**, Burgard M, Hubert JB, Aaron L, Rabian C, Pertuiset N, Lourenço M, Rothschild C, Rouzioux C. Impact of 5 years of maximally successful highly active antiretroviral therapy on CD4 cell count and HIV-1 DNA level. *AIDS* 2004;18:45– 49.

**Von Sydow M**, Gaines H, Sönerborg A, Forsgren M, Pehrson PO, Strannegård O. Antigen detection in primary HIV infection. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988; 296(6617):238-40. Erratum in: *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988; 296:525.

**Watanabe D**, Ibe S, Uehira T, Minami R, Sasakawa A, Yajima K, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y, Yamamoto M, Kaneda T, Shirasaka T, 2011. Cellular HIV-1 DNA levels in patients receiving antiretroviral therapy strongly correlate with therapy initiation timing but not with therapy duration. *BMC Infectious Diseases* 2011;11: 146.

**Waters L**, Mandalia S, Randell P, et al. The impact of HIV tropism on decreases in CD4 cell count, clinical progression, and subsequent response to a first antiretroviral therapy regimen. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1617–1623

- Wottawa A**, Klein G, Altman H, 1974. A method for the isolation of human and animal lymphocytes with Ficoll-Urografi. *Weiner Klin Wochenschr*, 1974;86:161-163.
- Wu Y**. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology*.2004; 1-13.
- Yamaguchi J**, Devare SG, Brennan CA. Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:925-30.
- Yen-Lieberman B**, Brambilla D, Jackson B, et al. Evaluation of a Quality Assurance Program for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma by the AIDS Clinical Trials Group Virology Laboratories. *J Clin Microbiol* 1996;34:2695-701.
- Yerly S**, Günthard HF, Fagard C, Joos B, Perneger TV, Hirschel B, Perrin L; Swiss HIV Cohort Study: Proviral HIV-DNA predicts viral rebound and viral setpoint after structured treatment interruptions. *AIDS* 2004;18:1951-1953.
- Yerly S**, Simon F, Perrin L. Early diagnosis of primary HIV infections: using a combined screening test (p24 antigen and anti-HIV antibodies). *Schweiz Med Wochenschr*. 1999;129:319-22.
- Yokoyama M**, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural dynamics of HIV-1 envelope Gp120 outer domain with V3 loop. *PLoS One*. 2012;7.
- Yukl SA**, Li P, Fujimoto K, Lampiris H, Lu CM, Hare CB, Deeks SG, Liegler T, Pandori M, Havlir DV, Wong JK. Modification of the Abbott RealTime assay for detection of HIV-1 plasma RNA viral loads less than one copy per milliliter. *J Virol Methods*. 2011;175:261-5.
- Zanchetta M**, Walker S, Burghel N, Bellanova D, Rampon O, Giaquinto C, De Rossi A. Long-term decay of the HIV-1 reservoir in HIV-1-infected children treated with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, 2006;193:1718-1723.
- Zhang ZQ**, Wietgreffe SW, Li Q, Shore MD, Duan L, Reilly C, Lifson JD, Haase AT. Role of substrate availability and infection of resting and activated CD4<sup>+</sup> T cells in transmission and acute simian immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci*, 2004; 101:5640-5645.
- Zhu TF**, Muthui D, Holte S, et al. Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 2002;76:707-16.