

Il volto a valutare il trattamento del KS classico avanzato con indinavir in associazione a chemioterapia convenzionale con vinblastina e bleomicina. Lo studio si proponeva di determinare il numero e la tipologia delle risposte ottenute al termine della terapia, la tossicità ed il profilo farmacocinetico dei farmaci in studio, la modulazione dei più importanti marcatori biologici di risposta alla terapia ed i marcatori biologici predittivi della risposta. Lo studio, che ha ricevuto un finanziamento AIFA nell'ambito della ricerca indipendente sui farmaci ed un finanziamento nell'ambito del Programma Nazionale AIDS del Ministero della Salute, ha confermato la sicurezza e l'attività antitumorale degli HIV-PI anche in pazienti con KS classico avanzato. Sono attualmente in corso studi per la valutazione dei biomarcatori di risposta alla terapia.

Caratterizzazione dei genotipi circolanti dell'integrasi di HIV-1 nel Sud del Sudan.

Studio privo di finanziamento per il 2019. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.

La distribuzione delle forme genetiche di HIV-1 è geograficamente ben localizzata, e l'Africa, soprattutto quella sub-sahariana, ne rappresenta la moltitudine. Nel Sudan del sud, a causa di 40 anni di guerra civile, sono disponibili pochi dati sulla circolazione dei ceppi di HIV-1. In particolare ad oggi, non esistono dati disponibili sulla circolazione dei polimorfismi genetici dell'integrasi (IN). In questo studio, abbiamo caratterizzato i polimorfismi del gene *IN* in ceppi virali circolanti prima dell'introduzione degli INSTI. Una parte del gene *pol* che comprende la regione codificante IN di 30 soggetti sieropositivi è stato amplificato e sequenziato direttamente tramite metodo Sanger. L'analisi filogenetica ha rivelato che i sottotipi A1, C e D e le forme ricombinanti erano 20%, 10%, 37% e 33% rispettivamente. Sebbene circolino sottotipi diversi, il gene *IN* ha mostrato un modello di sequenza di amminoacidi relativamente conservato, con solo due mutazioni di resistenza INSTI E92K, R263K e una mutazione della resistenza accessoria nella posizione G140K, suggerendo la comparsa di varianti dovute ad attivi movimenti delle popolazioni attraverso i confini del Sudan durante la guerra civile.

Development and use of non-integrating lentiviral vectors as a novel and safe delivery system for a vaccine against HIV-1.

Progetto finanziato dalla Ricerca Finalizzata – Ministero della Salute. Centro Nazionale Salute Globale.

Il progetto, coordinato dal Centro Nazionale per la Salute Globale, prevede lo sviluppo di un vaccino basato su un nuovo e sicuro sistema di veicolazione dell'antigene di HIV in grado di indurre una risposta immunologica forte e persistente nel tempo. Tale vettore lentivirale integrasi-difettivo (IDLV) esprimente Env di HIV è in grado di stimolare una forte risposta immunologica antigene-specifica in diversi modelli preclinici. Questo progetto prevede di immunizzare primati non umani (NHP) con IDLV esprimenti antigeni di HIV e di valutare la risposta immunologica anticorpale. Nell'ambito di

questo progetto, nel 2019 abbiamo valutato il ruolo delle cellule muscolari nell'immunità a lungo termine indotta dalla vaccinazione IDLV. Abbiamo iniziato a valutare se IDLV persiste nel sito di iniezione e fornisce un'espressione dell'antigene prolungata nel tempo. A questo scopo abbiamo immunizzato topi BALB/c con IDLV-GFP per via intramuscolare (IM) o sottocutanea (SC). L'espressione di GFP nel sito di iniezione e nei linfonodi drenanti (dLN) è stata valutata mediante microscopia confocale. Cellule che esprimono GFP sono state rilevate nel sito di iniezione e in dLN 3 giorni dopo sia l'iniezione IM che SC, ma persistevano a livelli inferiori solo nel muscolo di topi immunizzati IM fino a 3 mesi dopo l'iniezione. Abbiamo quindi confrontato l'entità e la persistenza delle risposte delle cellule T antigene-specifiche indotte dalle due vie di immunizzazione mediante saggio IFN-ELISPOT. La risposta delle cellule T è stata rilevata fino a 90 giorni dopo la vaccinazione, indipendentemente dalla via di iniezione. Tuttavia, nei topi immunizzati con SC l'entità della risposta è diminuita più rapidamente rispetto ai topi iniettati con IM ($p < 0,05$). Al contrario, non è stato rilevato alcun calo significativo nelle risposte delle cellule T nei topi immunizzati con IM a 90 giorni, suggerendo che la via di iniezione e l'espressione persistente dell'antigene dalle cellule bersaglio trasdotte giocano un ruolo nella durata dell'immunità indotta da IDLV. Successivamente abbiamo valutato se le cellule muscolari di topi immunizzati IDLV-GFP possono presentare l'antigene alle cellule T tramite MHC-I. L'espressione di MHC-I è stata osservata in alcune delle fibre muscolari GFP+, supportando l'ipotesi che le cellule muscolari sono in grado di presentare l'antigene alle cellule T in vivo. Per verificare questa ipotesi abbiamo isolato mioblasti dai tessuti muscolari di topi BALB/c naïve di 3 settimane e li abbiamo differenziati in miociti per eseguire esperimenti di co-cultura con splenociti isolati da topi immunizzati IDLV-GFP. Mioblasti e miociti trasdotti con IDLV-GFP sono stati in grado di stimolare splenociti specifici per GFP, valutato mediante saggio IFN- γ ELISpot. Il trattamento con un anticorpo anti-MHC-I ha determinato una significativa riduzione delle risposte dei linfociti T, confermando la capacità delle cellule muscolari primarie di presentare l'antigene attraverso MHC-I. Questi dati suggeriscono che il muscolo scheletrico è un serbatoio di antigeni per IDLV che contribuisce all'immunità a lungo termine indotta da IDLV.

Innovative human bispecific Ab construct targeting HIV replication, chronic inflammation and immune activation: a route for the cure and beyond.

Progetto finanziato dalla Ricerca Finalizzata – Ministero della Salute. Centro Nazionale Salute Globale.

La maggior parte degli individui con infezione da HIV in terapia antiretrovirale presentano viremia residua e infiammazione cronica sistemica persistente, che rappresentano i principali ostacoli per il raggiungimento di una cura. Approcci terapeutici finalizzati al loro controllo possono rappresentare una strategia efficace per interferire con il circolo vizioso che s'instaura tra l'attivazione immunitaria

e la persistenza di HIV e che è alla base del deterioramento della risposta immunitaria e dello sviluppo di condizioni patologiche. In questo contesto, l'obiettivo di questo progetto, coordinato dal Centro per la Salute Globale e iniziato a dicembre 2019, è di sviluppare nuovi costrutti anticorpali umani monoclonali bispecifici (bs-mAbs) che hanno come bersaglio due molecole/meccanismi patologici, ovvero CCR5 e CCR2/CCL2. Questi bs-mAbs avranno il vantaggio di interferire simultaneamente con l'ingresso/replicazione dell'HIV e con l'infiammazione e potranno essere utilizzati come componenti di strategie terapeutiche complesse mirate alla cura funzionale dell'infezione da HIV, così come per bersagliare l'infiammazione mediata da CCR2 e CCR5 nelle malattie croniche non trasmissibili e nei tumori. Gli obiettivi specifici del progetto prevedono: 1) definire l'effetto del blocco singolo e combinato di CCR5 e CCR2/CCL2 sulla replicazione virale e sulle risposte antivirali nelle cellule immunitarie che rappresentano i principali bersagli dell'infezione da HIV; 2) isolare un pannello di mAbs monospecifici (ms-mAbs) umani contro CCR5, CCR2 e CCL2 e ingegnerizzare bs-mAbs contro CCR5 e CCR2 e contro CCR5 e CCL2; 3) definire l'effetto antivirale dei mAbs sviluppati in appropriati modelli ex vivo e in vivo. Nel corso del 2018 abbiamo iniziato lo sviluppo di un bs-mAb basato su due mAbs umanizzati già noti: PRO140 e Plozalizumab, rivolti rispettivamente contro il CCR5 e il CCR2. Questo bs-mAb verrà utilizzato per effettuare uno studio di "proof-of-concept" per valutare l'effetto del blocco simultaneo del co-recettore CCR5 e dell'asse CCR2/CCL2 sulla replicazione di HIV e sullo stato infiammatorio. Gli ms-mAbs PRO140 e Plozalizumab sono stati espressi in formato scFv (single chain Fragment variable), che rappresenta un ottimo elemento di partenza per la realizzazione di costrutti anticorpali più potenti. Gli scFv sono dei singoli polipeptidi costituiti dai domini variabili (V) delle catene pesanti (H) e leggere (L) degli Ab naturali, unite mediante una regione amminoacidica linker. Nello specifico, le sequenze geniche del dominio variabile della catena pesante (VH) e della catena leggera (VL) degli Abs PRO140 e Plozalizumab sono stati clonati in vettori di espressione eucariotici, esprimendo le sequenze CH2 e CH3 dei domini Fc invece delle intere regioni Fc. Inoltre, per ridurre effetti indesiderati Fc-dipendenti (citotossicità mediata da anticorpo), sono state inserite mutazioni LALA nel dominio CH2. Sono in corso esperimenti per valutare il riconoscimento dell'antigene da parte dei costrutti e il mantenimento della loro funzionalità rispetto agli Ab originari in saggi di chemiotassi.

Progetto CASA (progetto di ricerca operativa).

Progetto finanziato dal Ministero della Salute e, da giugno 2015, dalla Cooperazione Italiana allo Sviluppo (Convenzione: MAE-DGCS, REP 1798 del 19/06/2015). Centro Nazionale Salute Globale. L'Africa subsahariana rimane l'area geografica maggiormente colpita dalla pandemia da HIV, nonostante le molteplici iniziative internazionali dirette a contrastare la diffusione dell'infezione. La fragilità dei sistemi sanitari, la scarsa integrazione dei servizi e la mancanza di finanziamenti adeguati

sono i principali ostacoli alla possibilità di garantire all'intera popolazione di questa regione africana l'accesso ai servizi sanitari e gli stessi standard di cura dei paesi economicamente più sviluppati. In un contesto di estrema fragilità e povertà, come quello subsahariano, è centrale il ruolo assunto dalla ricerca operativa, il cui obiettivo è l'ottimale utilizzo delle risorse disponibili per una maggiore efficacia degli interventi.

Il primo paese coinvolto nel progetto è l'Etiopia. Il contributo italiano alla lotta alla povertà è stato, in Etiopia, di notevole rilevanza, con interventi in settori di cruciale importanza, come l'istruzione, l'energia e l'organizzazione dei servizi sanitari. La lotta all'epidemia HIV/AIDS in Etiopia rientra negli obiettivi prioritari che il nostro paese intende perseguire.

Il progetto CASA è in linea con le priorità sanitarie stabilite dal Governo Etiope, che riconosce una stretta correlazione tra miglioramenti in campo sanitario e sviluppo economico del paese.

Condotto dall'ISS in partenariato con due Istituzioni Etiopi (Tigray Health Bureau e Mekelle University), il progetto prevede un'articolata attività di training e la raccolta multicentrica di dati epidemiologici su una coorte di pazienti con HIV/AIDS che intraprendono la terapia antiretrovirale. Lo studio CASA è stato inizialmente finanziato dal Ministero della Salute e, in tempi successivi (giugno 2015), dalla Cooperazione Italiana allo Sviluppo (oggi Agenzia Italiana per la Cooperazione allo Sviluppo, AICS). Nel 2017 allo studio è stato attribuito un ulteriore finanziamento (AICS, Ministero della Salute) per la prosecuzione delle attività nei prossimi tre anni, fino alla prevista chiusura.

Obiettivi e risultati attesi. Lo studio ha l'obiettivo di contrastare la diffusione dell'infezione da HIV attraverso il miglioramento della *retention in care* dei pazienti. Tale obiettivo è perseguibile attraverso la realizzazione di un modello di cura caratterizzato dal coinvolgimento attivo delle Associazioni di volontariato dei pazienti con HIV (Adherence Supporters, ADSs) nel percorso terapeutico dei singoli pazienti. Sono attesi risultati in termini di [1] abilitazione del personale infermieristico all'attività di trainer (*train the trainer approach*); [2] miglioramento di capacità comunicative e conoscenze su HIV/AIDS sia da parte del personale infermieristico che degli ADSs; [3] maggiore partecipazione degli ADSs alla gestione della cura del paziente.

A. Attività formativa svolta nel 2019

Il training, rivolto al personale sanitario (prevalentemente infermieristico) e agli ADSs, si è articolato come prosecuzione del percorso precedentemente svolto. È stato effettuato un passaggio verso un maggior livello di complessità e specificità, tramite l'introduzione di nuovi temi. Per quanto riguarda la formazione su HIV/AIDS, il campo è stato allargato alle coinfezioni. Nel training sulla comunicazione è stata di centrale importanza l'introduzione del concetto di *differentiated care*

(approcci di cura centrati sulle diversità dei bisogni delle persone con infezione da HIV), che pone le basi per modelli differenziati di ART delivery.

In continuità con la metodologia adottata negli anni precedenti, il training ha previsto l'alternarsi di sessioni “face-to-face” e periodi di formazione a distanza rivolte ai due gruppi di partecipanti al corso (personale infermieristico e ADSs). Sono state organizzate in loco tre sessioni “face-to-face” in marzo, settembre e dicembre 2019 (per un totale di 6 seminari). La formazione a distanza è stata realizzata negli intervalli tra un seminario e l'altro, ed è stata finalizzata al pieno raggiungimento degli obiettivi del corso (tramite l'approfondimento degli argomenti introdotti e discussi durante i seminari). Il materiale formativo relativo alle presentazioni face-to-face e di approfondimento è stato stampato per i partecipanti e reso disponibile sul sito web CASA.

1. *Training “face-to-face” sulla comunicazione (1-5 marzo 2019; 19-24 settembre 2019).* Training rivolto sia al personale infermieristico che agli ADSs, al fine di rafforzare lo scambio e la sinergia tra le due parti. Il contenuto e la modalità didattica sono stati pianificati in base alle osservazioni effettuate durante il monitoraggio dell'apprendimento a distanza. Le lezioni hanno seguito la stessa struttura per entrambi i gruppi: [1] condivisione degli elaborati realizzati dai partecipanti al training nell'ambito dell'apprendimento a distanza; [2] individuazione dei concetti poco chiari e dei punti chiave negli stessi elaborati; [3] discussione in gruppo; [4] introduzione di un nuovo argomento di studio; [5] assegnazione delle attività di auto-apprendimento.

2. *Training “face-to-face” su HIV/AIDS (1-5 marzo 2019; 19-24 settembre 2019).* Il training, rivolto esclusivamente al personale infermieristico, mirava ad accrescere e consolidare le conoscenze teoriche e pratiche su particolari patologie infettive spesso associate alla malattia da HIV (coinfezioni). Fine ultimo del programma, è quello di abilitare i discenti al trasferimento delle acquisite conoscenze, inizialmente agli ADSs coinvolti nel progetto e successivamente (al termine del percorso formativo) al personale infermieristico operante in altre strutture sanitarie.

Argomento del primo incontro sono state le malattie sessualmente trasmesse. Nel secondo seminario è stata invece trattata la coinfezione HIV/tubercolosi. La didattica ha seguito le seguenti fasi: [1] descrizioni introduttive delle diverse forme cliniche di malattia; [2] presentazioni di casi clinici; [3] risoluzione di alcuni dei casi clinici complicati (lavoro di gruppo); [4] presentazione e discussione di brevi relazioni su casi clinici relativi ai temi trattati nella precedente sessione ed approfonditi nel periodo di apprendimento a distanza.

3. *Valutazione finale (5-10 dicembre 2019).* Durante il seminario di dicembre si è tenuto un esame, finalizzato alla valutazione complessiva del percorso formativo svolto. Le prove hanno avuto caratteristiche diverse per ADSs e personale infermieristico. Una volta sostenute le prove, tutti i partecipanti hanno avuto un feedback individuale che ha evidenziato punti di forza e criticità rilevate.

4. *Apprendimento a distanza.* Nel corso dei seminari “*face-to-face*”, è stato consegnato ad ogni discente il materiale didattico sugli argomenti da approfondire ed assegnati compiti da svolgere nel successivo quadrimestre di auto-apprendimento. È stata data indicazione di svolgere le attività in gruppo e di organizzare momenti di condivisione tra ADSs e personale infermieristico. Lo staff locale ha avuto incontri regolari con i discenti nel corso dell'anno, al fine di verificare l'avvenuto svolgimento dei compiti, stimolare la riflessione sugli argomenti trattati, rilevare le difficoltà incontrate durante il percorso di apprendimento.

B. Ricerca operativa

1. *Studio longitudinale (coorte CASA).* La raccolta multicentrica di dati epidemiologici ha avuto inizio a gennaio 2013, su una coorte di pazienti con HIV/AIDS che iniziavano la terapia antiretrovirale presso le sette strutture sanitarie partecipanti al progetto. La coorte è attualmente composta da circa 2600 pazienti. I dati aggiornati, regolarmente prelevati dal personale locale (*monitor*) nel corso delle periodiche visite di monitoraggio presso le strutture sanitarie partecipanti, vengono assemblati in un database centrale (Mekelle University) e successivamente trasmessi all'ISS attraverso l'area condivisa di un sito web (*virtual office*). Sui dati raccolti viene mensilmente eseguita un'analisi descrittiva, visualizzabile nel sito web del Progetto (www.casaproject.info).

2. *Ruolo degli Adherence Supporters.* Gli ADSs hanno assunto un ruolo chiave nel processo di integrazione e recupero delle informazioni sui pazienti persi al follow-up. Mobilitati sul territorio, essi hanno cercato di rintracciare tali pazienti per poi indurre gli stessi a riprendere i controlli clinici e il percorso terapeutico, attraverso l'utilizzo di strategie persuasive apprese durante il training. Gli ADSs hanno sistematicamente raccolto, su apposita modulistica, specifiche informazioni poi trasferire in un database per successive analisi. L'intervento diretto degli ADSs è stato talvolta necessario a rilevare l'avvenuto decesso del paziente, informazione non sempre ottenibile da altre fonti.

STUDIO GF-ISS Prevenzione della trasmissione materno-infantile dell'HIV in Malawi: analisi dell'aderenza materna ai programmi e salute infantile nel primo anno dal parto.

Progetto finanziato dall'Agenzia Italiana per la Cooperazione allo Sviluppo – Centro Nazionale per la Salute Globale.

Dal 2011 il Malawi ha adottato, per la prevenzione della trasmissione verticale dell'HIV (PMTCT) la cosiddetta Option B+, cioè il trattamento di tutte le donne in gravidanza indipendentemente dal loro stato di malattia con continuazione del trattamento per tutta la vita. Questo ha permesso di ridurre i tassi di trasmissione ai bambini a meno del 9% nel 2013. Il successo dell'Option B+ in Malawi è dovuto all'alto tasso di accesso alle cliniche pre-natali delle donne (> 95%) e a una strategia di test di opt-out. La copertura con la terapia antiretrovirale delle donne in gravidanza ha raggiunto l'84% nel 2016.

Inoltre, il Malawi ha introdotto degli identificativi unici per i bambini esposti per permettere il loro monitoraggio e l'eventuale "tracing". La diagnostica dell'eventuale infezione nel bambino viene promossa con un test a 6 settimane (EID, early infant diagnosis) e poi a 12 e 24 mesi.

Permangono alcune importanti problematiche: sebbene la copertura con la terapia antiretrovirale (ART) delle donne in gravidanza sia alta, è stato tuttavia dimostrato che solo il 73% delle donne che iniziano una terapia in gravidanza sono ancora seguite e in terapia 12 mesi dopo l'inizio della ART. Per quanto riguarda l'EID solo il 70% dei bambini riceve un test HIV entro i 2 mesi di età.

Con sempre più donne che vivono con HIV e ricevono la ART in gravidanza è inoltre molto importante capire gli outcomes a lungo termine dei loro bambini, che sono esposti già in epoca prenatale al trattamento, spesso fin dal concepimento. I bambini nati da madri HIV-positive (bambini "esposti" all'HIV e alla ART) sono sempre più riconosciuti come un gruppo con bisogni di salute specifici. Molti studi hanno dimostrato un'aumentata morbilità (soprattutto su base infettiva) e mortalità in questi bambini prima dell'introduzione dell'Option B+ mentre non sono disponibili dati con la nuova strategia preventiva. Le cause di questa aumentata morbilità e mortalità non sono note (e la mancanza di informazioni sulle cause rende difficili eventuali interventi) ma probabilmente coinvolgono una risposta immunitaria disfunzionale anche se un possibile impatto del crescere in una famiglia con HIV non va sottovalutato.

L'alta incidenza delle malattie infettive, che va comunque confermata, in parte può essere dovuta al ridotto transfer transplacentare degli anticorpi materni (il contributo dei bassi anticorpi materni va delucidato per mettere in atto possibili strategie di immunizzazione materna) e dall'altra ad insufficienti risposte vaccinali, con un possibile impatto negativo su morbilità e mortalità.

Inoltre, gli studi effettuati in precedenza non hanno potuto raccogliere dati contemporanei su una coorte di bambini non-esposti rendendo più difficile capire i rischi effettivi di questa popolazione

Lo studio clinico osservazionale GF-ISS prevede l'arruolamento di 150 donne HIV-positive all'ultima visita pre-natale prima del parto (36° settimana) e dei loro bambini. Lo studio seguirà madri e bambini fino a 12 mesi dopo il parto. Verrà messo a punto un questionario per lo studio dell'aderenza al programma delle madri postpartum. Il questionario sarà informatizzato attraverso un software specifico, testato dallo staff locale, somministrato alle donne perse al follow-up che verranno rintracciate dal Counsellor dello studio.

Verrà inoltre arruolata, nelle stesse maternità dove nascono i bambini esposti, una coorte contemporanea di bambini nati da madri HIV-negative (150 bambini non-esposti) che parimenti verranno seguiti per 12 mesi dopo il parto.

Il Progetto ha i seguenti obiettivi:

1. contribuire a definire le cause della bassa retention nei programmi durante il postpartum delle donne in Option B+ e quindi contribuire a diminuire il tasso di perdita al follow-up;
2. contribuire ad aumentare la EID nei bambini esposti;
3. aumentare le conoscenze che permettano di definire se i bambini esposti sono o no una popolazione a rischio sanitario aumentato, che necessitino di sorveglianza e interventi specifici;
4. stabilire nei 2 gruppi di bambini la validità protettiva delle risposte vaccinali a 3 importanti vaccini (HBV, Rotavirus, Pneumococco) per definire se sono necessarie schedule vaccinali diverse nei bambini nati da madri HIV-positivie.

Nel gennaio 2019 è iniziato l'arruolamento delle donne HIV-positivie e HIV-negative e dei loro bambini. Alla fine dell'anno erano state arruolate 230 donne (140 HIV-positivie e 90 HIV-negative). La fine dell'arruolamento è prevista per il 31 marzo 2020. Sono state effettuate 50 visite domiciliari per la valutazione dell'aderenza al programma delle donne HIV-positivie e sono stati compilati i relativi questionari. Nel corso della visita che viene effettuata 6 settimane dopo il parto sono stati raccolti dai bambini arruolati campioni di Dried Blood Spots che permetteranno la valutazione del passaggio transplacentare delle immunoglobuline materne.

Sviluppo di vaccini innovativi contro l'Herpes simplex virus di tipo 1 e 2.

Progetto privo di finanziamento nel 2019. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.

Scopo del progetto è lo sfruttamento delle attività immunomodulatorie di Tat di HIV-1 per lo sviluppo di un vaccino anti-Herpes 1 e 2. Infatti, nonostante i progressi scientifici ed i numerosi tentativi fatti, non esiste ad oggi un vaccino preventivo o terapeutico contro Herpes simplex di tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) che può essere causa di gravi patologie nell'infante e nel soggetto immunodepresso o immunodeficiente, incluso l'anziano. Inoltre, la cronicità delle infezioni erpetiche in generale, che ciclicamente vanno incontro a riattivazioni, è ritenuta un fattore importante nell'immunosenescenza e nell'invecchiamento stesso della persona infetta. Benché sia ancora controverso, si ritiene che la risposta cellulare linfocitaria, ed in particolare la risposta citotossica dei linfociti T CD8+ (CTL), sia determinante nel controllo ed eventuale eradicazione dell'infezione erpetica.

Nostri studi hanno dimostrato che la proteina Tat ha importanti attività immunomodulatorie che comprendono: i) l'induzione dell'attivazione e maturazione di cellule dendritiche verso un fenotipo capace di indurre risposte di tipo Th1 (richieste per l'induzione di risposte antivirali e CTL); ii) la modulazione dell'attività proteolitica dell'immunoproteasoma che si traduce nell'aumento del numero degli epitopi antigenici riconosciuti da CTL, potenzialmente rilevanti per la protezione.; iii) l'aumento del rilascio da parte di CTL anti-herpes di fattori solubili importanti per la risposta antivirale quali IFN γ , granzyme B e IL2; iv) l'aumento di linfociti T CD8+ memoria effettori anti-herpes che

nell'uomo sono associati al controllo dell'infezione (fase asintomatica); l'aumento in linfociti T CD8+ attivati dell'espressione di T-bet, Eomes, Blimp-1 e BCL2, geni associati alla fase asintomatica dell'infezione.

Pertanto, un ceppo HSV-1 è stato attenuato o reso non replicante ed ingegnerizzato per esprimere la proteina Tat di HIV-1. Il vettore attenuato è stato inoculato in due diversi ceppi di topi ed in entrambi è stata dimostrata l'induzione di CTL contro un più ampio spettro di epitopi virali e la protezione contro l'infezione con una dose letale di un ceppo erpetico patogeno. Questi dati indicano che l'inclusione di *tat* in vettori erpetici HSV, attenuati e/o incompetenti per la replicazione rappresenta una strategia nuova e molto promettente per lo sviluppo di un vaccino antierpetico preventivo o terapeutico, che potrebbe essere applicata anche ad altre infezioni erpetiche quali quelle da EBV, CMV, VZV. Il progetto si propone pertanto di confermare la sicurezza, l'immunogenicità e l'efficacia dei vettori erpetici esprimenti *tat* già disponibili e dei nuovi che verranno prodotti nell'ambito del progetto, in piccoli animali (topi e cavie). Per quanto concerne la sicurezza, saranno costruiti vettori esprimenti il gene della luciferasi per studiare la biodistribuzione in vivo negli animali vaccinati. I vettori erpetici attenuati e/o incompetenti per la replicazione verranno poi confrontati per la loro immunogenicità nei due modelli animali, e quelli più promettenti (uno scelto fra quelli solo attenuati ed uno fra quelli attenuati ed incompetenti per la replicazione) saranno scelti per gli studi di efficacia sia preventiva che terapeutica. L'efficacia preventiva verrà valutata come la capacità degli animali vaccinati di resistere all'infezione sperimentale con una dose letale o sub-letale di un virus erpetico di tipo 1 o 2 patogeno. Quella terapeutica valuterà la capacità del vaccino di impedire la riattivazione erpetica in cavie infettate latentemente con herpes. Verranno infine investigate le correlazioni fra le risposte immuni anticorpali e cellulari indotte dai vaccini sperimentati e la protezione osservata, al fine di identificare correlati di protezione potenzialmente utili per la valutazione di vaccini anti-erpetici nell'uomo ma anche per determinare lo stato di immunocompetenza contro HSV-1 e HSV2 in soggetti infetti e non vaccinati. Allo scopo di ottenere il finanziamento per continuare a svolgere questo studio, nel 2019 esso è stato presentato come progetto alla Ricerca Finalizzata, finanziata dal Ministero della Salute.

Ruolo della proteina Tat di HIV-1 nella genesi e persistenza dei *reservoir* virali.

Progetto finanziato nell'ambito della Ricerca Finalizzata – Ministero della Salute. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.

Benché l'uso di farmaci antiretrovirali nella terapia dell'infezione da HIV risulti nella soppressione della replicazione virale e della carica virale, il virus persiste indefinitamente nei così detti *reservoir* (serbatoi) di virus latente. In questi compartimenti, HIV è presente in forma di DNA virale silente integrato (*DNA provirale*) o non integrato (*DNA extra-cromosomico*) nel genoma della cellula ospite. Le cellule

T CD4+ “memoria” ed “helper” follicolari costituiscono i principali *resevoir* di *DNA provirale*. Macrofagi e cellule dendritiche sono, inoltre, in grado di accumulare e conservare particelle virali di HIV in forma non replicante per lunghi periodi di tempo e rappresentano, pertanto, ulteriori importanti serbatoi di virus persistente. I *resevoir* vengono generati assai precocemente nell’infezione e sono insensibile alla terapia ed invisibili al sistema immunitario, che hanno per target solo il virus in attiva replicazione. I *resevoir* di persistono pertanto indefinitamente, anche dopo l’inizio della terapia cART. I serbatoi virali non sono statici ma, al contrario, vanno incontro ad un processo dinamico di continua deplezione e ri-approvvigionamento (*replenishment*). Questo processo dinamico assicura al virus il costante ed indefinito equilibrio dei serbatoi virali, anche nei soggetti in trattamento con i farmaci antiretrovirali. Si ritiene che la continua deplezione di cellule *resevoir* sia prevalentemente determinata dalla senescenza cellulare e dalla riattivazione spontanea del virus. Il virus latente è infatti accumulato in cellule dall’*emivita* assai elevata ma non illimitata; inoltre, la riattivazione di HIV causa effetti *citopatici* che possono portare a morte la cellula ospite. Benché la riattivazione di HIV possa avvenire anche in assenza di effetti *citopatici*, particolarmente in macrofagi e cellule dendritiche, l’espressione del virus espone la cellula ospite all’azione eradicante dell’immunità cellulo-mediata. Si ritiene che il *replenishment* dei *resevoir* sia determinato dai seguenti fattori: proliferazione omeostatica delle cellule T infettate volta a reintegrare la deplezione per morte cellulare, espansione clonale di cellule T infettate latentemente, replicazione/re-infezione residua in compartimenti tessuto linfatico caratterizzati da concentrazioni sub-ottimali di farmaci. Studi recenti indicano, inoltre, che le cellule endoteliali promuovono attivamente sia la replicazione produttiva che la latenza di HIV in cellule T CD4+ non attivate (*resting T CD4+ cells*). Le cellule endoteliali sembrano, pertanto, svolgere un ruolo chiave sia nella creazione dei serbatoi di latenza che nel loro continuo *approvvigionamento*.

Allo scopo di eradicare i *resevoir* virali, sono state recentemente sperimentati composti in grado di riattivare HIV in pazienti trattati con farmaci antiretrovirali (strategie *shock-and-kill*). Trials clinici controllati basati su queste terapie hanno tuttavia prodotto risultati insoddisfacenti. Per contro, il vaccino terapeutico Tat sviluppato al Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS sperimentato in trial vaccinali di fase II condotti in Italia e Sud Africa ha indotto una significativa riduzione del DNA provirale nel sangue, un marcatore dei serbatoi di latenza di HIV-1. In particolare, a otto anni dalla vaccinazione, il DNA provirale è sceso al di sotto della soglia di rilevazione in una o più misurazioni nel 33% dei pazienti. Il progetto si propone pertanto di chiarire i meccanismi con cui il vaccino Tat agisce sui *resevoir* virali, allo scopo di identificare nuove cure contro HIV in grado di “attaccare” i serbatoi di virus latente e di eradicare il virus. In particolare, gli obiettivi del progetto sono i seguenti:

1. Valutare gli effetti di Tat sulla riattivazione di virus latente. Studi recenti indicano che Tat sia in grado di riattivare HIV in cellule T CD4+ senza indurre attivazione cellulare ed effetti citopatici, ovvero senza danni per la cellula *reservoir*. Ciò configura, pertanto, un meccanismo per l' indefinito mantenimento ed accrescimento dei *reservoir*. Il vaccino Tat potrebbe bloccare questo meccanismo poiché è in grado di indurre anticorpi anti-Tat neutralizzanti. Questa parte degli studi viene condotta aggiungendo Tat a cellule infettate latentemente o isolate da pazienti trattati e misurando la produzione di virus, i parametri di attivazione cellulare e la sopravvivenza delle cellule trattate in presenza-assenza di anticorpi anti-Tat.
2. Valutare gli effetti di Tat nella replicazione di HIV nei compartimenti ove i farmaci antiretrovirali raggiungono concentrazioni subottimali. La replicazione/infezione "residua" di HIV in questi compartimenti è estremamente limitata ed i livelli viremici raggiunti nei pazienti sono identificabili solo con saggi ad elevatissima sensibilità. Pertanto, l'infezione procede in questi compartimenti a dosi di virus (molteplicità di infezione) assai basse e sub-ottimali. I nostri dati indicano che Tat lega Env sulla superficie del virus, formando un complesso di entrata in grado di favorire l'infezione a bassa molteplicità di infezione. Questo meccanismo potrebbe pertanto essere chiave per la capacità di HIV di infettare cellule target in presenza di dosi sub-ottimali di farmaci e per il costante approvvigionamento dei *reservoir*. Sulla base di questi studi è possibile valutare la capacità di anticorpi anti-Tat di bloccare l'infezione Tat-mediata in presenza di concentrazioni sub-ottimali di farmaci antiretrovirali in vari modelli cellulari.
3. Valutare il ruolo di Tat nell' induzione della replicazione produttiva e della latenza di HIV in cellule T CD4+ da parte di cellule dendritiche, endoteliali e monociti/macrofagi. I nostri studi e studi di altri gruppi di ricerca hanno dimostrato che Tat svolge un ruolo chiave nel *cross talk* tra cellule endoteliali e monociti/macrofagi, cellule dendritiche, e cellule T CD4+. Pertanto, questi studi sono volti a studiare gli effetti di Tat sull'infezione di cellule endoteliali e sulla trans-infezione e la trasmissione di HIV da parte di cellule endoteliali a monociti/macrofagi, cellule dendritiche, e cellule T CD4+. L'effetto di anticorpi anti-Tat verrà studiato anche in questi modelli di infezione.

I risultati fin qui ottenuti confermano la capacità della proteina Tat extracellulare di riattivare il virus latente nei modelli in vitro utilizzati e di indurre infezione produttiva e latente in cellule endoteliali attivate, le quali sono in grado di trasmettere HIV a cellule T CD4+. In questo contesto, è iniziata presso gli *Istituti Fisioterapici Ospedalieri* (IFO) di Roma la fase preparatoria dello studio osservazionale ISS OBS T-005, il cui Protocollo è stato approvato dal Comitato Etico competente nel 2018. Lo studio consentirà di verificare gli effetti di Tat sulla dinamica dei serbatoi di latenza di HIV in soggetti infettati trattati o naïve per la terapia. Sono in corso di perfezionamento i sistemi

sperimentali per lo studio degli effetti di Tat sulla riattivazione di HIV latente nei linfociti T CD4+ dei pazienti.

Studi preclinici e clinici sugli effetti anti-angiogenici ed antitumorali degli inibitori della proteasi di HIV nella prevenzione dello sviluppo e progressione del carcinoma della cervice uterina.

Studio privo di finanziamenti per il 2019. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.

Nonostante l'introduzione dello screening di prevenzione di massa, il carcinoma cervicale invasivo (CC) è il terzo tumore più frequente nelle donne a livello mondiale e il primo in Africa, rappresentando una causa importante di morbosità e mortalità. Il rischio di sviluppo CC è fortemente aumentato dall'infezione persistente di cellule epiteliali cervicali con ceppi di papillomavirus umano (HPV) ad alto rischio oncogenico (HR), l'agente causale del CC. È importante sottolineare che una frazione significativa di CC è causata da ceppi HR-HPV non coperti dai vaccini HPV attualmente in uso, e che lesioni displastiche della cervice uterina (CIN) possono progredire in CC invasivo nonostante trattamento chirurgico. La terapia del CIN/CC potrebbe quindi trarre notevoli benefici da interventi farmacologici efficaci, volti a colpire bersagli mirati.

L'incidenza e l'aggressività del CIN sono particolarmente drammatici in donne co-infettate da HIV/HPV. Nelle pazienti HIV+, tuttavia, le nuove terapie antiretrovirali combinate (cART) hanno ridotto la comparsa di lesioni CIN o la loro progressione in CC. In tale contesto numerosi dati preclinici e clinici indicano che farmaci antiretrovirali appartenenti alla classe degli inibitori della proteasi di HIV (PI) esercitano effetti diretti anti-angiogenici e antitumorali contro diversi tumori, compreso il CC, indipendentemente dalla loro attività anti-HIV, indicando che questi farmaci potrebbero rappresentare nuovi candidati antitumorali.

L'obiettivo di questo progetto è quello di studiare di studiare gli effetti e di indagare il meccanismo di azione dei PI nella prevenzione dell'insorgenza o progressione del CC utilizzando topi transgenici per le onco-proteine E6/E7 di HPV (topi K14-HPV16/E2) che sviluppano lesioni CIN/CC dopo l'esposizione ad estrogeni, in collaborazione con l'IRCCS Istituto di Candiolo – FPO. In questo modello la progressione del CIN avviene mediante l'attivazione di un "interruttore angiogenico" che porta alla progressione in cancro invasivo, consentendoci quindi di condurre studi specifici sui meccanismi di azione dei PI a livello delle lesioni stesse. I risultati preliminari indicano che gli HIV-PI sono in grado bloccare la crescita e promuovere la regressione di CC nei topi transgenici. Questo effetto antitumorale è associato ad inibizione dell'angiogenesi all'interno delle lesioni, a riduzione dei livelli di metalloproteinasi della matrice (MMP) -9, del complesso tra vascular endothelial growth factor (VEGF) e il suo recettore, e al concomitante aumento dei livelli dell'inibitore tissutale della metalloproteinasi-3 (TIMP-3), un inibitore naturale dell'attività di MMP. Questo studio identifica l'asse pro-angiogenico MMP-9/VEGF e la sua modulazione da parte di TIMP-3 come nuovi bersagli

molecolari degli HIV-PI e indica che questi farmaci sono in grado di bloccare lo sviluppo e progressione del CC.

In parallelo agli studi in vivo sono stati studiati gli effetti antitumorali degli HIV-PI in linee cellulari CIN/CC in vitro, inclusi effetti su proliferazione, differenziazione, apoptosi e invasione tumorale, espressione/attivazione di MMP come anche sulle vie di trasduzione del segnale deregolate dalle onco-proteine E6 e E7 di HPV. I risultati di questi studi indicano che gli HIV-PI sono in grado di inibire l'attività e l'espressione della metalloproteasi della matrice extracellulare MMP-9, un enzima che ha un ruolo chiave nello sviluppo del CIN e della progressione in CC, mediante un blocco della via di trasduzione del segnale AKT/Fra-1 in cellule CIN in vitro (Bacigalupo I et al., *Oncology Letters* 2017).

Nel loro insieme questi risultati possono portare a nuove indicazioni terapeutiche dell'HIV-PI (drug repositioning) per il trattamento del CC e di altri tumori in pazienti con infezione da HIV o non infetti.

Markers predittivi di risposta persistente alla terapia antiretrovirale: correlazione della presenza di anticorpi anti-Tat con durability dell'efficacia terapeutica.

Progetto privo di finanziamento nel 2019. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.

La terapia antiretrovirale combinata (cART) blocca la progressione verso l'AIDS ma non è in grado di eradicare l'infezione. Benché non rilevabile nel sangue periferico (limite di rilevazione: <40 copie di RNA virale per ml di plasma) la replicazione virale residua, dovuta a incompleta soppressione virale o a riattivazione stocastica, contribuisce in maniera importante all'infiammazione cronica e disregolazione immunitaria osservate in soggetti in cART efficace ed allo stesso tempo assicura il mantenimento dei serbatoi virali e conseguente compromissione del sistema immune. In effetti la ricostituzione del sistema immune nel soggetto virologicamente soppresso è spesso parziale, come indicato da un recupero incompleto del numero dei linfociti CD4 circolanti, dal mancato ristabilimento del rapporto CD4/CD8 e delle sottopopolazioni linfocitarie (naive, memory, effector), dal persistere d'immunoattivazione (CD38, HLA-DR). Di qui l'importanza di identificare marcatori in grado di distinguere chi andrà incontro nel medio/lungo termine al fallimento terapeutico da chi invece continuerà a rispondere bene all'ART, al fine di migliorare il management clinico e fornire ai pazienti una corretta informazione sul loro stato clinico.

A questo riguardo, dati epidemiologici del nostro e di altri gruppi hanno dimostrato che anticorpi anti-Tat sono rilevabili solo in una minoranza (circa 30%) dei soggetti HIV+ e che la loro presenza si associa ad una ridotta o assente progressione della malattia e ad una più rapida e maggiore responsività alla terapia antiretrovirale. Tat (TransAttivatore della Trascrizione) è la prima proteina prodotta dall'HIV, è essenziale per un'efficiente replicazione virale, è rilasciata dalle cellule infette ed esercita numerosi effetti disregolatori, inclusa l'attivazione e il richiamo di linfociti CD4, alimentando così la

replicazione e diffusione del virus. A questo riguardo va sottolineato che la cART non ha effetto sull'espressione di geni virali, incluso Tat, che è misurabile anche dopo anni di cART. Inoltre, Tat, prodotto da provirus integrato o non integrato può indurre replicazione virale da entrambi. Tat costituisce pertanto un bersaglio critico per ridurre la replicazione virale residua ed attaccare il serbatoio virale. I risultati ottenuti con l'intensificazione della cART con il vaccino Tat in trial clinici terapeutici di fase I e II corroborano questa ipotesi. In particolare, l'intensificazione della cART con il vaccino Tat ha promosso un significativo e durevole recupero dei linfociti T, e un incremento della percentuale dei linfociti T della memoria centrale (T_{cm}) CD4⁺ e CD8⁺, accompagnata da diminuzione delle cellule della memoria effettrice (T_{em}, CD4⁺ CD8⁺), dati che nell'insieme depongono per una riduzione dell'immunodisregolazione ed un ritorno verso l'omeostasi. Infine, da notare la lenta e progressiva riduzione del DNA provirale nel sangue, che ha raggiunto la significatività dopo 2 anni e con una stima di decadimento dopo 3 anni dalla vaccinazione del 70%. Questa riduzione è significativamente associata alla presenza di anticorpi anti-Tat.

Sulla scorta di queste evidenze epidemiologiche e sperimentali ci proponiamo di investigare retrospettivamente una serie di parametri immunologici, infiammatori e virologici in una coorte di soggetti (n=121) in trattamento efficace che hanno partecipato ad uno studio osservazionale prospettico (ISS OBS T-002, ClinicalTrials.gov NCT0102455) condotto in 8 centri clinici in Italia, monitorato e validato da una CRO in accordo con le regolamentazioni GCP e GLP. I soggetti arruolati fra il 2008 e 2011 sono stati seguiti in media per 2 anni con periodicità trimestrale. Dei 121 partecipanti, 33 (27,3%) avevano anticorpi anti-Tat all'arruolamento.

Il presente progetto si propone di delucidare in soggetti HIV⁺ virologicamente soppressi il contributo degli anticorpi anti-Tat naturalmente presenti alla durability terapeutica, in termini di recupero immunologico, riduzione dell'infiammazione, e riduzione del reservoir virale.

A questo scopo, ci proponiamo di:

- Valutare retrospettivamente biomarcatori solubili di immunoattivazione e infiammazione nei soggetti partecipanti all'ISS OBS T-002 e identificare quelli significativamente diversi in soggetti con o senza anticorpi anti-Tat.
- Valutare il carico di DNA provirale nella stessa coorte e determinare se sia significativamente diverso nei soggetti con e senza anticorpi anti-Tat.
- Correlare i biomarcatori investigati con parametri di ricostituzione immunologica (conte dei CD4, CD4/CD8 ratio, sottopopolazioni linfocitarie funzionali) per i quali i dati sono già disponibili (analisi eseguita in citofluorimetria a flusso su sangue periferico fresco).
- Utilizzare i dati raccolti per identificare markers prognostici di persistenza o di fallimento dell'efficacia terapeutica.

- Generare un algoritmo per migliorare la valutazione ed il monitoraggio del rischio di persistenza o di fallimento dell'efficacia del trattamento terapeutico adottato.

Il presente studio, longitudinale, sarà effettuato su campioni biologici criopreservati (PBMC, siero e plasma) raccolti longitudinalmente durante lo studio. Per garantire un'elevata qualità ed affidabilità dei risultati, i campioni oggetto di questo studio, raccolti dopo firma del consenso informato nei 9 centri clinici, sono stati spediti, congelati e conservati nella biobanca dedicata del Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS dell'ISS seguendo rigorose procedure operative standard uniformi per tutti i centri clinici, messe a punto nell'ambito di AVIP, un progetto integrato finanziato dalla Comunità europea, validate e già utilizzate in trials clinici di fase I preventivi (Clinicaltrials.gov Identifier NCT00529698 e Clinicaltrials.gov Identifier NCT01441193) ed in trials clinici di fase I e II.

Saranno analizzati solo i biomarcatori e i parametri misurabili con saggi validati per campioni congelati. Pertanto, i sieri e plasmidi dei 121 volontari arruolati nello studio osservazionale e raccolti nell'arco di 24 anni con cadenza trimestrale, saranno investigati a vari time point (almeno 3 determinazioni) per valutare biomarcatori di infiammazione e di attivazione immunitaria (D-dimero, IL-6, CXCL10, TNFalfa, e la proteina C reattiva ad alta sensibilità). I livelli plasmatici di sCD14, VCAM1 e ICAM1 verranno misurati per investigare l'attivazione di monociti e di cellule endoteliali. Per lo studio di questi biomarcatori verranno impiegati, saggi elisa e di citofluorimetria (multiplex Cytometric Bead Array, CBA) disponibili in commercio. In particolare, saggi ELISA validati saranno utilizzati per il dosaggio di hsCRP e DDimero. Il saggio multiplex CBA permetterà di valutare più analiti contemporaneamente (IL6, VCAM1, ICAM1, sCD14, TNFalfa, CXCL10) tramite lettura in citometria a flusso (citofluorimetro FACSCanto, BD). Il DNA provirale totale e non integrato sarà valutato mediante Real Time PCR utilizzando un Kit commerciale (Diateva s.r.l., Fano, Italia).

Con l'uso sempre più diffuso della cART, identificare parametri immunologici predittivi della durability della risposta terapeutica, e di converso del suo fallimento, costituisce un'importante priorità per il management clinico dei pazienti e, quindi, di sanità pubblica, ma rappresenta anche un'informazione essenziale da fornire al paziente in terapia.

Le informazioni fornite da questo progetto contribuiranno a identificare biomarcatori di rischio di fallimento o efficacia terapeutica e a chiarire il ruolo degli anticorpi anti-Tat nel controllo dell'infezione da HIV in soggetti in cART efficace, al fine di sviluppare nuove strategie di prevenzione e cura e/o migliorare quelle esistenti, nella prospettiva di un approccio medico sempre più personalizzato.

Caratterizzazione del profilo farmacocinetico e farmacogenetico di farmaci antiretrovirali, sottotipi di HIV, forme virali ricombinanti e varianti con mutazioni di resistenza a supporto della gestione clinica di pazienti HIV-positivi da popolazioni migranti o paesi in via di sviluppo.

Progetto privo di finanziamento per il 2019. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.

I regimi di combinazione di farmaci antiretrovirali (ARV) (cART) hanno ridotto grandemente la morbilità e la mortalità di soggetti HIV+ grazie alla loro capacità di sopprimere la replicazione virale e favorire il recupero immunologico. Una parte dei soggetti in trattamento, tuttavia, non raggiunge o mantiene una soppressione virologica adeguata a causa di una ridotta aderenza alla terapia, tossicità farmacologica, alterata farmacodinamica, resistenze virali.

Il raggiungimento di un'esposizione ottimale è fondamentale per il successo virologico della cART e, in ultima analisi, della loro efficacia terapeutica. Livelli di farmaci sub-ottimali sono infatti associati all'emergenza di ceppi resistenti che contribuiscono al fallimento virologico, mentre concentrazioni eccessivamente elevate aumentano il rischio di reazioni avverse ai farmaci.

I livelli plasmatici di ARV sono influenzati non solo dall'aderenza alla terapia ma anche dal background genetico della popolazione studiata. È ben documentata infatti un'elevata variabilità interindividuale legata alla presenza relativamente frequente di polimorfismi in geni codificanti per enzimi citocromiali coinvolti nel metabolismo dei diversi ARV.

La valutazione dei livelli plasmatici di ARV può aiutare ad identificare pazienti con concentrazioni adeguate, sub-terapeutiche o tossiche di farmaci, come anche ad identificare pazienti non aderenti. Tuttavia, le finestre terapeutiche degli ARV sono state stabilite sulla base di studi effettuati in paesi sviluppati su soggetti infettati con virus essenzialmente di sottotipo B. Ci sono pochi dati disponibili sull'effettivo raggiungimento dei range terapeutici e della loro validità in soggetti infettati con altri sottotipi virali e diverso background genetico, che vivono o provengono da paesi in via di sviluppo dove la prevalenza dell'infezione da HIV è più elevata, e dove c'è minore accesso all'assistenza sanitaria, inclusa la diagnosi, il monitoraggio immunologico e virologico dell'infezione, l'accesso alla terapia, ed in cui è ben documentata una minore aderenza. È stato ipotizzato inoltre che i differenti sottotipi virali di HIV-1 e forme ricombinanti abbiano differenti proprietà biologiche che potrebbero essere alla base non solo di una differente efficienza di trasmissione e di una diversa progressione della malattia ma anche di diversa sensibilità alla cART (Santoro & Perno, Microbiology 2013). È ben documentata infine la circolazione di ceppi virali con mutazioni che conferiscono resistenza a singoli ARV o intere classi di farmaci.

A causa dell'aumento del tasso di immigrazione, si stima che attualmente in Italia quasi un terzo delle nuove diagnosi di HIV sia di nazionalità straniera e che questo numero sia in costante aumento (http://www.iss.it/binary/ccoa/cont/HIV_AIDS_DIC_2015.pdf). Di conseguenza la frequenza in