

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+ ^amemoria^o ed ^ahelper^o follicolari costituiscono i principali *reservoir* 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 *reservoir* 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 *reservoir* 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-approvvisionamento (*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 *reservoir* 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 *reservoir* 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 di 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 *reservoir* 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 *reservoir* virali, allo scopo di identificare nuove cure contro HIV in grado di ^a attaccare^o 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 comparti ove i farmaci antiretrovirali raggiungono concentrazioni subottimali. La replicazione/infezione ^a residua^o di HIV in questi comparti è estremamente limitata ed i livelli viremici raggiunti nei pazienti sono identificabili solo con saggi ad elevatissima sensibilità. Pertanto, l'infezione procede in questi comparti 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, nel 2019 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. Nel 2020 è continuata la messa a punto dei sistemi sperimentali per lo studio degli effetti di Tat sulla riattivazione di HIV latente nei linfociti T CD4+ dei pazienti. In particolare, allo scopo di misurare con elevata affidabilità la latenza virale, è stata consolidata la collaborazione con l'Università Carlo Bo di Urbino che, nel quadro del programma, ha ottimizzato una nuova piattaforma basata sulla rilevazione e quantificazione del DNA virale totale ed ^aextracromosomico^o. La piattaforma, in grado di distinguere il DNA virale integrato, la cui determinazione fornisce informazioni sul decadimento del serbatoio di HIV ^apost-integrazione^o, e il DNA non integrato, che misura il decadimento del serbatoio di HIV ^apre-integrazione^o, nonché l'attività replicativa residua del virus nei pazienti in terapia antiretrovirale, ha superato tutte le fasi della validazione ed è caratterizzata, inter alia, da un incremento di sensibilità e precisione fino al 75% in più rispetto alla metodica ^aclassica^o. Nel 2020 è stata completata la fase di *pre-screening* sierologico di 370 pazienti; sulla base dei risultati di pre-screening e sono fino ad ora stati arruolati 6 volontari eleggibili per i quali sono state effettuate le analisi previste dal protocollo dello studio.

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 2020. 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 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 ottenuti e pubblicati nel corso del 2020 indicano che gli HIV-PI sono in grado di 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. Gli HIV-PI inoltre promuovono la deposizione di collagene IV sulla membrana basale epiteliale e vascolare e la normalizzazione sia dell'architettura che della

funzionalità dei vasi. Questa normalizzazione della vascolatura tumorale promossa dagli HIV-PI ha portato a riduzione dell'ipossia tumorale e miglioramento del rilascio e dell'attività antitumorale di farmaci chemioterapici convenzionale. 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. Questi risultati possono portare a nuove indicazioni terapeutiche dell'HIV-PI per il trattamento del CC e di altri tumori sia in pazienti con infezione da HIV che sieronegativi.

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 ed E7 di HPV. I risultati di questi studi sono in corso di pubblicazione ed 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.

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 2020. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.

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

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 (Tcm) CD4+ e CD8+, accompagnata da diminuzione delle cellule della memoria effettrice (Tem, 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 abbiamo investigato retrospettivamente una serie di parametri immunologici e virologici in una corte di soggetti (n=142) 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 118 partecipanti eligibili per lo studio, 23 (19,5%) avevano anticorpi anti-Tat all'arruolamento.

Il progetto si proponeva di delucidare in soggetti HIV+ virologicamente soppressi il contributo degli anticorpi anti-Tat naturalmente presenti alla durability terapeutica, in termini di recupero immunologico.

Sono stati analizzati i dati dei 121 volontari arruolati nello studio osservazionale e raccolti nell'arco di 24 anni con cadenza trimestrale.

I risultati ottenuti indicano che gli anticorpi anti-Tat che si sviluppano naturalmente nel corso dell'infezione in una minoranza dei soggetti si associano in coloro che sono da vari anni in cART efficace ad un recupero del numero dei linfociti CD4+ ed un controllo dell'infezione da HIV superiore a quello osservato in soggetti con le stesse caratteristiche ma privi di anticorpi anti-Tat rilevabili. In particolare, la presenza di risposte immuni a Tat era significativamente associata,

rispetto a coloro che non l'avevano, ad un valore di nadir dei linfociti CD4+ più alto, un maggiore controllo della viremia residua, ed un recupero delle conte di CD4 superiore, mentre non si evidenziano differenze in termini di immunoattivazione. In questo studio non si registrava alcun effetto della risposta anti-Env sull'andamento dei parametri analizzati.

Questi risultati sono stati oggetto di pubblicazione (Tripiciano et al, 2021).

Queste informazioni confermano la validità di utilizzare Tat come vaccino contro l'HIV-AIDS e saranno utili per 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.

Il numero delle nuove diagnosi di HIV in persone straniere tende a diminuire. Nel 2019, il 25,2% delle persone con nuove diagnosi di infezione da HIV era di nazionalità straniera. In Italia, il sottotipo B di HIV-1 è largamente diffuso, in particolare nella popolazione italiana autoctona. La popolazione straniera è invece infettata da sottotipi di HIV diversi dal sottotipo B. Dall'inizio degli anni '90 si iniziò ad osservare un aumento delle forme genetiche non-B di HIV-1 in Italia. In particolare, la frequenza di infezioni da forme genetiche HIV-1 non-B è aumentata dal 2,6% nel periodo 1985-1992 al 18,9% nel periodo 1993-2008 (Lai, HIV Med 2010) e molte delle forme non-B erano presenti nella popolazione immigrata. Queste persone, socialmente più fragili, sono notoriamente meno aderenti alla terapia e ciò potrebbe contribuire alla diffusione di varianti resistenti sia nelle comunità degli immigrati che nella popolazione generale.

Con il presente studio ci proponiamo di valutare il profilo farmacocinetico e farmacogenetico di ARV in soggetti HIV+ in trattamento cART provenienti da paesi in via di sviluppo in correlazione con sottotipi/varianti virali e ceppi con mutazioni di resistenza.

In particolare, stiamo studiando pazienti HIV+ in trattamento cART da 2 coorti coordinate dal CNAIDS, di circa 100 pazienti ognuna:

1. pazienti sudafricani arruolati presso la Mecru Clinical Research Unit, Sefako Makgatho Health Sciences University, Gauteng Province, Sud Africa, nell'ambito di studi immunovirologici in pazienti infetti da HIV.
2. migranti arruolati nell'ambito di un network che coinvolge 8 centri clinici italiani (Brescia, Prato, Firenze, Latina, Napoli, Bari, Cosenza, Lamezia Terme) (Sanarico, Ann Ist Super Sanità 2015), mirato alla sorveglianza della variabilità genetica di HIV in Italia;

Campioni di cellule e/o plasma di questi pazienti vengono valutati per i livelli plasmatici di ARV, polimorfismi dei geni codificanti per enzimi citocromiali coinvolti nel metabolismo degli ARV (nei soggetti con livelli di ARV al di fuori delle finestre terapeutiche), identificazione di sottotipi/forme ricombinanti di HIV-1, identificazione di ceppi con mutazioni di resistenza.

Lo studio delle concentrazioni di ARV raggiunte in soggetti con differente background genetico, infettati con altri sottotipi/varianti virali o ceppi resistenti potrebbe avere importanti ricadute non solo nella gestione clinica di pazienti appartenenti a popolazioni fragili, ma anche ai fini di una sorveglianza epidemiologica/molecolare delle varianti di HIV circolanti nella popolazione generale. Infatti, è ancora poco studiata la prevalenza in Italia dei sottotipi/ forme ricombinanti di HIV-1 e dei ceppi con mutazioni di resistenza in soggetti da paesi in via di sviluppo. Infine, dato che il dosaggio plasmatico di ARV è l'unico mezzo affidabile ed obiettivo per poter accertare il raggiungimento di un'esposizione farmacologica ottimale, lo studio del profilo farmacodinamico di ARV in popolazioni diverse da quelle occidentali infettate da virus non-B potrebbe fornire informazioni importanti per la valutazione di studi clinici terapeutici, in quanto i livelli di ARV hanno ricadute evidenti ed importanti sugli stessi indicatori utilizzati per valutare la loro efficacia.

Validazione di un *Realtime PCR assay* per la determinazione del DNA provirale di HIV.

Progetto privo di finanziamenti per il 2020. Centro Nazionale per la Ricerca su HIV/AIDS.

Lo sviluppo di un saggio per la determinazione del DNA provirale di HIV di facile esecuzione ed elevata affidabilità è essenziale per la misura dei reservoir virali, per la determinazione della persistenza di HIV e per la valutazione di terapie innovative funzionali e/o eradicanti. Il CNAIDS ha da alcuni mesi sviluppato un metodo per la determinazione del DNA provirale sia nella forma integrata nel genoma dell'ospite che nella forma non integrata (*extracromosomica*). Il metodo consiste nell'isolamento del DNA da cellule infettate latentemente, cellule di controllo e cellule del sangue periferico isolate da pazienti infettati con HIV, cui segue l'amplificazione delle sequenze integrate e non integrate di HIV (DNA *totale* virale). Il metodo è in grado, inoltre, di amplificare selettivamente il DNA provirale extracromosomico, consentendo di stimare per differenza la quantità di DNA virale integrato. L'obiettivo di questo progetto è la validazione del metodo. A questo scopo, sono in corso di valutazione i principali parametri di validazione del saggio in considerazione utilizzando linee cellulari infettate latentemente e campioni di sangue di pazienti naïve al trattamento o in trattamento con antiretrovirali. Questi studi si avvalgono di campioni di sangue provenienti da coorti di pazienti seguiti longitudinalmente sia in studi osservazionali che nei trial vaccinali Tat di fase I e II. Nel 2018 è inoltre iniziata la messa a punto di una metodica di

Single-Genome Amplification abbinata a *Next Generation Sequencing* per la determinazione dei genomi competenti e defettivi nei serbatoi di virus HIV latente. Sulla base di questi studi, nel 2020, è stata presentata una proposta di finanziamento che ha per obiettivo la determinazione dei meccanismi di decadimento dei serbatoi di virus latente nei soggetti immunizzati con il vaccino Tat. In particolare, lo studio si propone di determinare la cinetica di decadimento del DNA virale competente per la replicazione e delle forme di DNA virale ^a defettivo^o non replicante. Se finanziato, lo studio consentirà di chiarire se le modificazioni evidenziate dai serbatoi nel tempo riflettano la pressione selettiva esercitata dall'immunità cellulo-mediata e/o l'espansione clonale delle cellule infettate latentemente. A questo scopo, sono disponibili in ISS le biobanche dei campioni di sangue dei pazienti arruolati negli studi vaccinali in Italia ed in Sudafrica.

Applicazione del test dell'Indice di Avidità anticorpale anti-HIV alle nuove diagnosi di infezione da HIV.

Progetto privo di finanziamento per il 2020. Dipartimento Di Malattie Infettive.

La misura di incidenza e la conoscenza delle caratteristiche delle nuove infezioni da HIV rappresentano strumenti necessari per monitorare l'andamento dell'infezione e per stabilire programmi di prevenzione mirati. L'incidenza dell'infezione da HIV permette di conoscere l'attuale diffusione dell'infezione nella popolazione generale ed identificare i gruppi che sono maggiormente a rischio di infezione. Esistono test sierologici in grado di stabilire una datazione dell'infezione al fine di poter stimare l'incidenza di HIV in modo rapido e semplice come l'Indice di Avidità anticorpale anti-HIV (in inglese, Avidity Index = AI). L'AI permette di identificare le infezioni recenti (cioè quelle sier conversionsi avvenute nei 6 mesi precedenti al momento del prelievo, ≤6 mesi) e le infezioni non recenti (sier conversionsi avvenute prima degli ultimi 6 mesi antecedenti il prelievo, >6 mesi) da HIV, consentendo così di poter stimare l'incidenza dell'infezione da HIV.

L'identificazione delle infezioni recenti è particolarmente utile per scopi epidemiologici (diffusione dell'infezione, misura dell'incidenza, stima dei prevalenti, identificazione dei gruppi a rischio, futuri scenari epidemiologici), per scopi clinici (impostazione della terapia), per scopi preventivi (contact tracing, partner notification, valutazione di campagne di prevenzione) e per scopi di sanità pubblica (pianificazione sanitaria, previsioni di spesa). Il COA ha svolto uno studio in collaborazione con il Consortium for the Evaluation and Performance of HIV Incidence Assays (CEPHIA) per la stima

del tempo di infezione attraverso modelli matematici. I risultati di questo lavoro sono stati pubblicati in [BMC Infect Dis.](#) 2019;

Nel 2020, i partecipanti allo studio hanno aderito alla discussione per l'individuazione delle variabili sulle infezioni recenti verso la definizione della nuova scheda unica della sorveglianza HIV/AIDS, relativamente al progetto ^a Studio di fattibilità per l'unificazione dei due sistemi di sorveglianza HIV e AIDS, attraverso l'implementazione di una scheda unica di segnalazione e la costruzione di una piattaforma centralizzata nazionale di inserimento dati^o.

Mortalità delle persone con HIV/AIDS (Progetto incluso nel Piano Statistico Nazionale 2017-2020).

Progetto privo di finanziamento. Dipartimento Di Malattie Infettive.

Il COA provvede dal 1987 alla raccolta, analisi e pubblicazione dei dati relativi alle diagnosi di AIDS a fini epidemiologici, ma non dispone dell'aggiornamento dei decessi dei casi di AIDS e per questo collabora con ISTAT e il Centro di Riferimento Oncologico di Aviano (CRO). Ogni anno effettua il linkage tra i dati individuali sulle cause di morte e i casi di AIDS notificati al RAIDS analizzando la mortalità, la sopravvivenza e le cause multiple di morte delle persone con AIDS.

Il COA, inoltre, gestisce la sorveglianza delle nuove diagnosi di infezione da HIV e in collaborazione con ISTAT e il CRO di Aviano analizza con il medesimo metodo anche la mortalità dei pazienti con HIV, le cause multiple di morte e la sotto notifica del sistema di sorveglianza.

Nell'ambito di questi progetti è in corso uno studio sull'analisi del profilo di mortalità delle persone decedute per cause HIV/AIDS, ma, non segnalate al Registro Nazionale AIDS. In particolare, vengono analizzati i decessi in cui tra le cause di morte vi è menzionato uno dei codici ICD10 B20-B24 ± Malattia da HIV (secondo le regole dell'ICD10). Tra i decessi per AIDS vengono anche annoverati quei casi che, pur non avendo un codice B20-B24, presentano il codice R75 accompagnato da una malattia AIDS-defining.

In tale ambito nel 2020 il COA, insieme all' ISTAT e al CRO di Aviano, ha proseguito uno studio, già iniziato nel 2019, di cross-linkage tra dati del RAIDS e quelli del registro di mortalità dell' ISTAT relativo ai dati 2006-2012, allo scopo di individuare le incongruenze tra i due registri e fornire criteri aggiornati per l'identificazione dei casi di AIDS dai certificati di morte. A tal fine sono state analizzate le principali problematiche legate ai decessi per AIDS riscontrati nei certificati di morte e sono state confrontate le definizioni adottate dal sistema di sorveglianza AIDS con quelle adottate per il registro di mortalità basato sul sistema di classificazione ICD10.

I progetti effettuati sulle cause multiple di morte hanno come obiettivo l'analisi del profilo di mortalità per causa delle persone con AIDS in Italia. Essi si basano su una procedura di record-linkage individuale (utilizzando variabili identificative in forma anonima) tra i soggetti inclusi nel Registro Nazionale AIDS e i certificati di morte raccolti dall'ISTAT nell'ambito della Rilevazione su decessi e cause di morte. Per ciascuno dei soggetti linkati vengono prese in considerazione tutte le patologie riportate nel certificato di morte, ovvero le cause multiple di morte. L'utilizzo di tale dato consente di analizzare informazioni aggiuntive rispetto a quelle fornite dalla sola causa iniziale, tipologia di dato tradizionalmente più diffusa nell'ambito delle statistiche ufficiali di mortalità.

In tale ambito nel 2020 il COA, insieme all'ISTAT e al CRO di Aviano, ha lavorato su uno studio retrospettivo, con dati relativamente agli anni 2006-2015, con lo scopo di valutare l'eccesso di mortalità per malattie epatiche nelle persone con AIDS rispetto alla popolazione generale utilizzando i dati sulle cause multiple di morte. I risultati dello studio sono stati pubblicati su *HIV Medicine* (2020).

Progetto ^aTesta o Cuore^o.

Progetto finanziato dall'Associazione Volontari Italiani del Sangue (AVIS). Dipartimento Di Malattie Infettive.

Il progetto ^aTesta o Cuore^o nato dalla collaborazione tra AVIS e il Centro Operativo AIDS dell'Istituto superiore di Sanità è iniziato nel 2017 i cui obiettivi sono:

- indagare i comportamenti e le conoscenze in tema di HIV e IST nei donatori di sangue e nelle persone sensibili alla donazione;
- individuare le aree di informazione errata o assente in tema di HIV e IST;
- aumentare la consapevolezza sul rischio di infezione da HIV e altre IST attraverso l'utilizzo di strumenti informativi che erogano contenuti scientifici.

Per il raggiungimento degli obiettivi è stato costruito un questionario suddiviso in due sezioni.

La prima parte dedicata alla raccolta dei dati anagrafici e dei comportamenti a rischio di HIV/IST e alla raccolta di informazioni idonee a stabilire il livello di conoscenza dell'HIV e delle altre IST.

La seconda sezione interattiva, finalizzata a mettere alla prova le conoscenze dei partecipanti sulle IST e al contempo fornire loro degli strumenti educativi al fine di ridurre i comportamenti a rischio.

Il questionario è stato diffuso attraverso il sito web e i canali social dell'AVIS ed è stato, altresì, divulgato dal Servizio Civile Nazionale, dal Forum Nazionale Giovani, AnAIDS e dai Centri di Servizio per il Volontariato.

La diffusione del questionario ha permesso ai partecipanti, attraverso una modalità agile e divertente, di poter verificare le proprie conoscenze e di acquisire un'informazione corretta e comprensibile mirata a prevenire queste infezioni, specialmente tra i giovani e tra i donatori di sangue.

Hanno partecipato all'indagine 11.257 persone di cui l'80% è risultata donatore di sangue con una età mediana di 34 anni. Quasi la metà dei partecipanti non si è mai informata sulle infezioni da HIV/IST e il 13% dei partecipanti riferisce di non essersi mai sottoposto al test HIV.

Nel 2020 è proseguito lo studio condotto sul sottogruppo dei donatori di sangue (N=9.021) che ha partecipato all'indagine allo scopo di indagare l'esistenza e la diffusione di comportamenti a rischio di infezione a trasmissione sessuale, nonché, il livello di conoscenza di queste infezioni nel campione di donatori di sangue. Tale studio è in corso di pubblicazione.

Progetto ^a Studio di fattibilità per l'unificazione dei due sistemi di sorveglianza HIV e AIDS, attraverso l'implementazione di una scheda unica di segnalazione e la costruzione di una piattaforma centralizzata nazionale di inserimento dati^o.

Progetto finanziato dal Ministero della Salute 2018-2020. Dipartimento Di Malattie Infettive.

Il progetto è iniziato a marzo del 2018 e si è concluso a settembre 2020. Il gruppo di studio è costituito dal Centro Operativo AIDS, dal Servizio Informatico dell'ISS, dal Ministero della Salute, dai rappresentanti delle Sorveglianze HIV regionali selezionate nelle tre aree geografiche del paese, dai rappresentanti delle principali associazioni non governative e da clinici esperti nella cura dell'HIV. Tale studio è nato dall'evidenza che in Italia sono presenti due sistemi di sorveglianza che raccolgono dati sull'infezione da HIV e di AIDS.

La sorveglianza HIV, istituita con Decreto nel 2008, raccoglie informazioni al momento della prima diagnosi di infezione da HIV e il Registro Nazionale AIDS, raccoglie informazioni al momento della diagnosi di AIDS. Allo stato dell'arte, come emerge dalle indagini condotte dal COA coesistono 22 differenti sistemi di sorveglianza di cui uno per le nuove diagnosi di AIDS e 21 per le nuove diagnosi di infezione da HIV. Tutto ciò comporta variabilità e disomogeneità tra i vari sistemi regionali con conseguenti difficoltà nell'unificazione e nell'analisi dei dati epidemiologici, nonché, l'impossibilità di linkare i dati notificati al RAIDS con quelli notificati alla Sorveglianza HIV in quanto il flusso informativo, la scheda di raccolta dati e l'identificativo individuale sono diversi.



Gli obiettivi del progetto sono quelli di: valutare la fattibilità dell'implementazione di una piattaforma unica nazionale per la sorveglianza HIV/AIDS; costruire una scheda unica di segnalazione, uniforme per tutte le regioni da utilizzare sia per la prima diagnosi di HIV che per la prima diagnosi di AIDS; individuare il codice identificativo univoco da utilizzare per la notifica delle nuove diagnosi di HIV e AIDS.

Nell'ambito dello studio sono stati esaminati e approfonditi i risultati di un'indagine condotta che aveva come obiettivo quello di descrivere i 21 sistemi regionali di sorveglianza HIV. I risultati della suddetta indagine sono stati fondamentali per definire il contenuto della scheda unificata HIV/AIDS. È stato, altresì, elaborato il formato elettronico della nuova scheda unificata. Sono state individuate, sia dal punto di vista informatico che normativo per la tutela della privacy dei dati personali e personali particolari, le soluzioni per il nuovo codice identificativo. È stato, ancora, definito il flusso dei dati, le applicazioni software per la raccolta degli stessi e il formato per garantire la crittografia dei dati, secondo la certificazione ISO 27001 per la sicurezza delle informazioni e la certificazione ISO per la protezione dei dati personali.

Nel corso del 2020 tutti i dettagli tecnici relativi all'elaborazione del prototipo di scheda sono stati raggruppati in un documento che è stato condiviso e approvato dal Data Protection Officer dell'ISS. È stato organizzato un workshop finale per la restituzione e la diffusione dei risultati a tutti i referenti delle sorveglianze regionali, nonché, a tutti gli esperti impegnati a vari livelli nel flusso della sorveglianza HIV/AIDS. Il workshop si è tenuto a dicembre 2020, su piattaforma online. Hanno aderito all'evento oltre ai partecipanti attivi del progetto (ISS, Ministero, referenti clini, medici infettivologi, alcuni referenti di sorveglianze regionali e delle associazioni) anche gli altri responsabili delle sorveglianze HIV/AIDS regionali e gli esperti impegnati a vari livelli nel flusso della sorveglianza HIV/AIDS.

Nel 2020 è stato pubblicato un articolo a stampa su quotidiano nazionale, con presentazione degli obiettivi del progetto.

Progetto "Percorso diagnostico-assistenziale delle IST: individuazione di criticità ed inapproprietezze nei percorsi; proposte operative di implementazione del sistema territoriale per un corretto inquadramento diagnostico assistenziale".

Progetto finanziato dal Ministero della Salute - fondi capitolo 4310, 2017-2019. Dipartimento di Malattie Infettive. Progetto privo di finanziamento nel 2020.

I soggetti con Infezioni Sessualmente Trasmesse (IST) costituiscono una popolazione estremamente eterogenea che, diversamente da altre patologie, non si concentra in centri specifici di assistenza ma piuttosto si rivolge a una molteplicità di specialisti e strutture sanitarie, pubbliche e private (medico di medicina generale, dermatologo, ginecologo, urologo, andrologo, farmacista, infettivologo, consultorio, laboratorio di microbiologia). Questa dispersione dei pazienti con IST sul territorio rende difficile descrivere il loro percorso, dal sintomo alla guarigione, e standardizzare le procedure sanitarie per ottimizzare tempi, costi ed efficacia dell'intervento medico.

Alla luce di queste evidenze è risultato urgente poter migliorare il controllo delle IST e dell'HIV, ridurre la loro incidenza e limitarne la diffusione conducendo un'analisi dettagliata dei percorsi e dei flussi delle persone con un sospetto di IST, evidenziando le inapproprietezze ed individuando soluzioni adeguate.

Per questo motivo, a marzo 2017 è nato il presente progetto coordinato dall'ISS (Unità Operativa 1, UO1) in collaborazione con l'Università Sapienza di Roma (Unità Operativa 2, UO2), che ha avuto l'obiettivo di analizzare il percorso diagnostico-assistenziale delle persone con una diagnosi di IST al fine di migliorare l'assistenza sanitaria in questo settore secondo i bisogni assistenziali del cittadino, di garantire la qualità delle cure, di migliorare l'appropriatezza diagnostico-terapeutica e di ottimizzare le risorse economiche.

Il progetto ha previsto due fasi.

- I fase: è stato condotto uno studio retrospettivo che ha coinvolto 4 Unità Operative (UO) di riferimento per la diagnosi delle IST delle strutture universitarie di Torino (UO3), Firenze (UO4), Napoli (UO5) e Palermo (UO6). Ogni UO ha prodotto, utilizzando i dati archiviati di richieste di analisi, un elenco di specialisti infra-struttura, che avevano richiesto accertamenti di laboratorio per le IST nei 12 mesi precedenti l'inizio dello studio.
- II fase: è stato condotto uno studio prospettico che ha portato alla realizzazione di una rete di specialisti infrastruttura (a cui, ciascuna UO di riferimento, ha fatto una formazione ad hoc per partecipare al Progetto). Questi specialisti hanno arruolato persone con una diagnosi confermata di IST e, per ciascun paziente, hanno raccolto (anonimamente) dati socio-demografici e clinici essenziali e ricostruito, sulla base dell'anamnesi patologica prossima, il percorso già effettuato da ciascuno in termini di visite, indagini microbiologiche e/o sierologiche e terapia per quella particolare IST. Gli specialisti hanno quindi riportato l'esito degli eventuali ulteriori accertamenti diagnostici e dei trattamenti prescritti al paziente, nonché l'efficacia della terapia valutata attraverso il follow-up. Inoltre, a tutti i pazienti

inclusi nello studio è stato proposto il test HIV e, in caso di esito positivo, il test di avidità anticorpale per valutare se si trattasse di un'infezione da HIV recente. Tutti i dati sono stati inseriti dagli specialisti in una piattaforma online appositamente creata per il progetto. L'ISS si è occupato del management e dell'analisi dei dati. L'ISS, l'Università Sapienza di Roma e tutte le UO hanno partecipato all'interpretazione e alla discussione dei dati.

I risultati preliminari del progetto sono stati presentati durante l'evento finale, organizzato a Roma il 19 febbraio 2019 dalle UO1 e UO2, che ha visto coinvolte tutte le UO ed è stato aperto all'esterno. L'evento dal titolo: *“Infezioni Sessualmente Trasmesse (IST) Scenari attuali e prospettive future: proposte operative per un corretto inquadramento diagnostico e assistenziale”* ha promosso le conoscenze e la ricerca relativa ai vari aspetti delle IST, ha presentato i risultati preliminari di un'analisi dettagliata dei percorsi e dei flussi delle persone con un sospetto di IST in Italia, evidenziando alcune criticità del sistema, individuando soluzioni adeguate per monitorare la diffusione di queste infezioni (compreso l'HIV) e proponendo percorsi diagnostico-terapeutici adeguati.

Il progetto si è concluso ufficialmente il 5 marzo 2019, le UO partecipanti hanno completato l'inserimento dei dati nella piattaforma web, così come stabilito nel cronoprogramma del progetto al fine di avere 12 mesi di raccolta dati. L'UO1 si è occupata del management e dell'aggiornamento dei dati, nonché della presentazione dei risultati definitivi nella Relazione scientifica finale inviata al Ministero della Salute.

L'UO1 ha lavorato alla preparazione di un Rapporto Istisan con i contributi apportati da tutte le relazioni del suddetto evento, al fine di raccogliere in un documento finale le idee, i suggerimenti e le proposte emerse durante la giornata. Il rapporto è stato pubblicato a settembre 2020.

Progetto *“Sperimentazione di nuovi modelli organizzativi integrati ospedale-territorio per la prevenzione e il controllo delle IST: percorsi diagnostico-assistenziali agevolati ed offerta di screening gratuiti mirati”* *Progetto realizzato con il supporto tecnico e finanziario del Ministero della Salute ± CCM 2019. Dipartimento di Malattie Infettive. Periodo 2019-2022.*

Il progetto, coordinato dall'ISS, è iniziato il 23 novembre 2019 e si propone di: 1) Sviluppare modelli innovativi per la creazione di reti basate su centri ospedalieri/universitari multidisciplinari ad alta qualità di cura per le IST (hub) integrati con le strutture del territorio (spoke), che riducano le barriere all'accesso ai servizi e che siano potenzialmente flessibili secondo le diverse realtà