Marzo 2010 Anno 11
Trimestrale di aggiornamento medico
Pubblicazione registrata al Tribunale di Milano n.71 del 10 febbraio 2006
Poste Italiane s.p.a. - Spedizione in Abbonamento Postale - D.L. 353/2003 (conv. In L. 27/02/2004 n.46) art. 1, comma 1, DCB Milano.

Editore: effetti© srl
ISBN: 978 88 87052 22 0
Direttore Scientifico: M. Moroni
Direttore Responsabile: F. Tacconi
Coordinamento editoriale: C. Balotta, L. Meroni
Stampa: Magicgraph srl
Via Galvani, 2 - 21052 Busto Arsizio (VA)

ReAd files

Numero 1

Resistenza e Adesione alle terapie nella cura dell'AIDS

editoriale

Resistenze a HIV e HBV: nuovi dati e nuove implicazioni cliniche

Gioacchino Angarano

Lo sviluppo di farmaci capaci di inibire numerosi virus, ha fornito possibilità terapeutiche imprevedibili per molte infezioni virali come quelle da herpes simplex, varicella-zoster, citomegalovirus, influenza A, virus epatitici B e C. La diffusione dell'uso di questi farmaci antivirali ha portato con sè l'emergenza di ceppi virali resistenti praticamente a ogni antivirale.
La descrizione di virus resistenti selezionati dai farmaci antivirali è, da alcuni, considerato un problema relativamente recente. In realtà il fenomeno recente non è, se si pensa che virus resistenti al primo antivirale disponibile, l'amantadina per l'influenza A, sono stati descritti ormai quaranta anni fa (1). L'imprevedibilità delle epidemie influenzali e la possibile, temuta, emergenza di ceppi virali ad alto potere patogeno hanno diffuso l'uso anche profilattico degli inibitori della neuraminidasi, favorendo lo sviluppo di resistenza e la diffusione di ceppi resistenti, anche per i farmaci di più recente introduzione (2, 3).
È ormai chiaro che per ogni virus sia praticamente inevitabile l'emergenza di resistenza virale nei confronti di qualsiasi farmaco, per quanto specifico e potente.
La farmacoresistenza risulta un problema emergente: per il singolo paziente, associata al fallimento di trattamenti spesso "salvavita" e ad un evidente peggioramento della prognosi di ciascuna infezione;

percorsi ragionati 4

4 Epidemiologia della resistenza primaria e secondaria — C. Balotta
7 Quando usare il test di resistenza — F. Ceccherini Silberstein
10 Quale test di resistenza? — M. Zazzi
13 Resistenze e *fitness* — M. Andreoni
16 Farmaci antivirali anti-HBV e farmacoresistenza — L. Milazzo
22 Linee Guida HBV: aggiornamento 2009 — M. Rizzetto

pratica clinica 25

26 Un caso complesso di meningite tubercolare — M. Franzetti
Il commento — F. Suter

Update dal laboratorio 30

Farmacoresistenza di HIV-1: i test di laboratorio — V. Micheli, M. Violin
Test di resistenza ai farmaci anti-HBV — L. Milazzo

meeting report 35

hot news 45

continua da pag. 1

per il servizio sanitario, per il quale determina una marcatissima lievitazione dei costi di trattamento; e per la comunità, nella quale il virus resistente può diffondersi, con conseguenze gravi e imprevedibili (4).

Nelle infezioni persistenti e croniche, nelle quali il trattamento deve essere particolarmente prolungato, il rischio di resistenza è aumentato in presenza di una soppressione virale sub-ottimale, come quella causata da farmaci o regimi di potenza inadeguata o dalla naturale, progressiva riduzione della adesione al trattamento, veramente difficile da contrastare.

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) ed il virus B dell'epatite (HBV), dei quali ReadFiles si occupa in questo numero, sono appunto due di tali infezioni persistenti.

Si tratta di virus e patologie per alcuni aspetti simili, ma enormemente distanti per altri. Alcuni farmaci, ad esempio, sono efficaci in entrambe le infezioni, ma esistono anche importanti differenze. Mirati a bersagli virali diversificati (trascrittasi, proteasi, integrasi, ecc.), i farmaci anti-HIV (4), mirati ad un solo bersaglio (la trascrittasi) quelli anti-HBV; proprio per questo, nelle infezioni dovute a quest'ultimo virus, la barriera genetica dei farmaci assume un'importanza vitale.

Sebbene il frammento di gene virale interessato, il numero di mutazioni associate, l'interferenza con la capacità di replicazione virale *(fitness)* di queste mutazioni, il grado di resistenza causato e l'intimo meccanismo della resistenza differiscano anche notevolmente tra i vari farmaci, la farmacoresistenza di HIV e di HBV è ormai nota nei confronti di ogni farmaco di ciascuna classe di antivirali sviluppata (5).

La possibilità di ridurre il rischio di sviluppo di resistenza si basa su due cardini. In primo luogo, il rischio di emergenza di resistenza si riduce con l'aumentare della soppressione della replicazione virale e con il ridursi del tempo in cui il virus continua a replicarsi sotto la pressione selettiva del farmaco; perciò, la modalità più efficace per ridurre lo sviluppo di resistenza consiste, tanto nelle infezioni da HIV che in quelle da HBV, nel ridurre la replicazione virale il più profondamente possibile ed il più rapidamente

possibile (6). In secondo luogo, proprio per quanto detto, in entrambe le infezioni è fondamentale riconoscere al più presto la resistenza con i test appropriati ed adeguare conseguentemente il trattamento antivirale. Per questo sono così importanti e diffusi i test che consentono di individuare con precisione presenza e caratteristiche della resistenza (7).

Nell'infezione da HIV la loro importanza è tanto marcata da essere stati inseriti a pieno titolo nelle linee guida terapeutiche. Nell'infezione da HBV l'importanza dei test di resistenza risulta più controversa, anche per la limitatezza dei bersagli terapeutici.

Termini e concetti come terapia combinata, resistenza crociata, barriera genetica e *fitness* sono entrati nel linguaggio quotidiano prima dei medici che si occupano del trattamento delle infezioni da HIV e, successivamente, di quelli che si occupano di HBV e saranno più volte incontrati nella lettura di questo numero di ReadFiles.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. **Oxford JS, Logan IS, Potter CW.** In vivo selection of an influenza A2 strain resistant to amantadine. *Nature 1970; 226, 82-83*.
2. **Hayden FG.** Antiviral resistance in influenza viruses-implications for management and pandemic response. *N. Engl. J. Med. 2006; 354:785-788.*
3. **Regoes RR, Bonhoeffer S.** Emergence of drug-resistant influenza virus: population dynamical considerations. *Science. 2006; 312:389-391.*
4. **Monno L, Punzi G, Brindicci G, et al.** A multidrug-resistant (MDR) HIV type 1 infection in a homosexual man and identified source patient. AIDS Res Hum Retroviruses. 2007 Oct; 23(10):1293-5. Wilson LE, Gallant JE. HIV/AIDS: the management of treatmentexperienced HIV-infected patients: new drugs and drug combinations. *Clin Infect Dis. 2009; 48:214-21.*
5. **Zoulim F, Locarnini S.** Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology. 2009 Nov; 137(5):1593-608.*
6. **Havlir DV, Richman DD.** Viral dynamics of HIV: implications for drug development and therapeutic strategies. *Ann Intern Med 1996; 124: 984-94.*
7. **Simen BB, Simons JF, Hullsiek KH, et al.** Low abundance drug-resistant viral variants in chronically infected HIV-infected, antiretroviral treatment-naive patients significantly impact treatment outcomes. *J Infect Dis 2009; 199:693-701.*

Direttore Clinica delle Malattie Infettive, Università degli Studi di Bari, Azienda Ospedale-Università "Policlinico", Bari

Claudia Balotta
Dipartimento di Scienze Cliniche, Sezione di Malattie Infettive e Immunopatologia Ospedale "L. Sacco", Università di Milano

Epidemiologia della resistenza primaria e secondaria

I nuovi dati epidemiologici, basati su un più ampio uso clinico del test di resistenza genotipico, mostrano una forte rilevanza del fenomeno della resistenza primaria

Malgrado l'evoluzione della resistenza agli antiretrovirali sia un evento considerato, in una certa misura, ineludibile, in quanto è molto difficile ottenere una aderenza e una farmacocinetica ottimali, l'introduzione dell'HAART negli anni '90 e la disponibilità attuale di combinazioni di antiretrovirali ad alta efficacia hanno governato le proporzioni allarmanti della resistenza primaria e secondaria, che sono state osservate dopo il largo uso di terapie subottimali in prima linea o nelle linee successive.
Dopo la pubblicazione di diversi studi di sorveglianza che avevano il limite principale della rappresentatività della popolazione in studio, negli ultimi 10 anni la disponibilità dei saggi genotipici e il loro largo utilizzo nella pratica clinica hanno fornito scenari più attendibili sia della resistenza trasmessa sia di quella acquisita.

La resistenza primaria

Nell'epoca precedente all'HAART la resistenza primaria in alcuni paesi, in particolare nelle aree metropolitane, aveva raggiunto percentuali allarmanti intorno al 30% (1). Mentre studi europei alla fine degli anni '90 hanno evidenziato una tendenza alla riduzione dovuta all'effetto di popolazione dell'HAART (2), questo effetto non veniva osservato negli USA, dove la spesa dei trattamenti è coperta solo da assicurazioni private. In aggiunta a dati di sorveglianza condotti presso diversi Centri clinici italiani, gli studi più rappresentativi condotti in Italia hanno coinvolto la coorte I.Co.N.A., successivamente la coorte ARCA (Antiretroviral Resistance Cohort Analysis) e più recentemente lo studio SPREAD (3-6).
La tabella 1 mostra le prevalenze della resistenza primaria per classi di farmaci in questi studi che coprono gli ultimi 11 anni.
Nello studio ICoNa era stato osservato un andamento bifasico caratterizzato da una riduzione negli anni '96-'99 (dal 22.5% al 9.5%) e un aumento negli anni '00-'01 (23.9%). Il decremento iniziale era associato a una riduzione della viremia plasmatica, ma era stato verosimilmente vanificato dal numero consistente di fallimenti terapeutici nella popolazione trattata, precedente alla disponibilità attuale sia di nuovi farmaci che di nuove associazioni (3).
Come mostrato, inoltre, la resistenza primaria era superiore nei soggetti a sieroconversione recente (SCs), rispetto a quelli con nuova diagnosi (NDs) e infezione cronica in quanto, in assenza di terapia, in questi ultimi i ceppi mutati revertono a *wild type*. Al contrario, tra gli SCs dello studio recente SPREAD, la prevalenza della resistenza trasmessa era inferiore, permettendo di ipotizzare un decremento della resistenza trasmessa dovuta ai nuovi regimi HAART. Tuttavia, la resistenza per NNRTI indicava un preoccupante incremento in analogia con quanto osservato negli USA, in Inghilterra e, in misura minore in tutti i paesi europei (7) indicando che le proporzioni epidemi-

Tabella 1 Prevalenza della resistenza primaria in Italia

Studio	Periodo	Globale	NRTI	NNRTI	PI
ARCA (NDs = 1.690)	1996-2007	13.3	11	6	4
SPREAD (SCs = 42)	2002-2005	9.5	2.4	7.1	4.8
SPREAD (NDs = 229)	2002-2005	12.7	8.7	5.2	2.6
I.Co.N.A. (SCs = 112)	1996-2001	16.1	14.3	0.9	2.7
I.Co.N.A. (NDs = 347)	1996-2001	12.4	7.8	4.6	1.7

SCs: soggetti con data di sieroconversione nei 12 mesi precedenti l'arruolamento nello studio
NDs: soggetti con nuova diagnosi e durata dell'infezione non nota

Tabella 2 Prevalenza della resistenza secondaria in Italia

Studio	Periodo	Globale	NRTI	NNRTI	PI
ARCA (n = 13.547)	1999-2006	81	77	44	43
Studio START*	2003-2007	-	78.8	41.1	65.9

*La % di resistenza è calcolata sui pazienti in trattamento con la specifica classe di farmaci ARV

I dati sulla prevalenza della resistenza secondaria all'uso dei farmaci mostrano percentuali elevate in tutti i paesi, e per tutte le classi di farmaci antiretrovirali, con un *trend* verso la diminuzione

che di questo fenomeno rimanevano rilevanti.
Inoltre, la resistenza trasmessa, come evidenziato anche dallo studio ARCA (6), è risultata ancora associata al sottotipo B, tuttavia, può essere "diluita" dal massiccio ingresso dei sottotipi non-B che, provenendo da aree dove la disponibilità degli antiretrovirali è molto limitata, continuano a essere sensibili in larga misura ai farmaci.

La resistenza secondaria

Sino alla fine degli anni '90, le conoscenze relative alla proporzione della resistenza secondaria provenivano da studi a numerosità e rappresentazione geografica limitate, che avevano riguardato la sperimentazione di nuovi farmaci o nuove classi di farmaci nei pazienti che erano andati incontro a fallimento terapeutico multiplo. I primi dati americani e francesi, largamente sovrapponibili indicavano che i) la prevalenza della resistenza genotipica di classe era intorno all'80% per gli NRTI, del 40% per gli NNRTI e al 30% per i PI, ii) la resistenza concomitante a NRTI e PI era intorno al 50%, a NRTI e NNRTI al 40%, a NRTI e PI al 30%, iii) la multiresistenza alle 3 classi era del 25% (8-9), iv) ciò era indipendente dalle condotte prescrittive e dai sistemi sanitari assicurativi e v) il fattore più importante che ha determinato questi alti livelli di resistenza era la disponibilità di regimi efficaci solo a breve termine.
La tabella 2, riporta i dati di due studi multicentrici italiani (ARCA e START) condotti in Italia (10-11). I due lavori differiscono parzialmente nel disegno dello studio, tuttavia

L'andamento di questi fenomeni sarà più chiaro con un'analisi prospettica dei dati che comprenda l'uso delle nuove classi e dei nuovi ARV

entrambe indicano prevalenze di resistenza di classe elevate e comparabile a quelle rilevate in Europa e negli USA.

Ciononostante, i *trend* temporali mettono in evidenza negli intervalli studiati un decremento significativo della resistenza alle tre classi principali, sia considerate singolarmente, sia in associazione come effetto della potenza dei regimi HAART attualmente disponibili (11).

La valutazione prospettica nei prossimi anni insieme alle valutazioni dei nuovi farmaci in uso e delle nuove classi disponibili permetterà di comprendere i *trend* futuri di questo fenomeno.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. **Pillay D.** Current patterns in the epidemiology of primary HIV drug resistance in North America and Europe. *Antivir Ther 2004; 9: 695-702.*

2. **Yerly S, Vora S, Rizzardi P, et al.** Acute HIV infection: impact on the spread of HIV and transmission of drug resistance. *AIDS 2001; 15: 2287-92.*

3. **Violin M, Velleca R, Cozzi-Lepri A, et al.** Prevalence of HIV-1 Primary Drug Resistance in Seroconverters of the ICoNA Cohort Over the Period 1996-2001. *Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes. 2004; 36:761-764.*

4. **Perno CF, Cozzi-Lepri A, Balotta C, et al for the I.CO.N.A Study Group.** Low prevalence of primary mutations associated with drug resistance in antiviral-naive patients at therapy initiation. *AIDS 2002; 16: 619-24.*

5. **Riva C, Lai A, Caramma I, Corvasce S, et al.** C. Transmitted HIV Type 1 drug resistance and Non-B subtypes prevalence among seroconverters and newly diagnosed patients from 1992 to 2005 in Italy. *AIDS Res Hum Retroviruses. 2010; 26: 41-9.*

6. **Bracciale L, Colafigli M, Zazzi M, et al.** Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance in HIV-1-infected patients in Italy: evolution over 12 years and predictors. *J Antimicrob Chemother. 2009; 64: 607-15.*

7. **The SPREAD programme.** Transmission of drug-resistant HIV-1 in Europe remains limited to single classes. *AIDS 2008, 22:625-635.*

8. **Richman DD, Morton SC, Wrin, et al.** The prevalence of antiretroviral drug resistance in the United States. *AIDS 2004, 18:1393-14001.*

9. **Tamalet C, Fantini J, Tourres C and Yahi N.** Resistance of HIV-1 to multiple antiretroviral drugs in France: a 6-year survey (1997-2002) based on an analysis of over 7000 genotypes. *AIDS 2003, 17:2383-2388.*

10. **Di Giambenedetto S, Bracciale L, Colafigli M, et al.** Declining prevalence of HIV-1 drug resistance in treatment-failing patients: a clinical cohort study. *Antivir Ther 2007; 12: 835-9.*

11. **Balotta C, Casazza G, Antinori A, et al for the START Study.** Decreasing Temporal Trends of Class Resistance in a Multicenter National-based Study (START Study) Over a 5 Year Interval. *CROI 2009, Montreal Febryary 8-11. Abs 671.*

ReAdfiles

Quando usare il test di resistenza

Francesca Ceccherini Silberstein
Laboratorio di Virologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Roma Tor Vergata, Roma

Quando il trattamento antivirale non riesce a sopprimere interamente la replicazione virale, in pochi giorni, settimane, o mesi, possono selezionarsi e/o svilupparsi varianti virali con mutazioni di resistenza. Per questa ragione, una buona conoscenza del fenomeno della farmacoresistenza, e la sua attenta diagnosi e interpretazione sono di fondamentale importanza nella gestione di pazienti HIV-1+ (1-4).
Il test di resistenza genotipico, basato sul sequenziamento delle specie virali maggioritarie, è usato di *routine* per impostare strategie terapeutiche ottimali, al fine di controllare la replicazione virale in pazienti *"drug-naive"* e in pazienti in fallimento terapeutico. Nei pazienti *naive* il test mira all'identificazione di varianti virali farmacoresistenti trasmesse (resistenza primaria). Nei pazienti in fallimento, è usato per individuare le ragioni virologiche di fallimento, mirando all'identificazione di mutanti selezionati dalla terapia antivirale stessa (resistenza secondaria). Interessante notare che nelle ultime linee guida DHHS (4) è indicato specificamente quando usare il test genotipico o quello fenotipico per indirizzare la terapia in pazienti trattati che presentano viremia rilevabile durante il trattamento (vedi tabella 1).

Le ultime linee guida DHHS indicano in modo specifico l'uso del test genotipico o fenotipico nei pazienti con viremia rilevabile durante il trattamento

Tabella 1 Quando usare il test di resistenza

Raccomandazioni delle linee guida DHHS (aggiornate il 1 dicembre 2009)
• Il test di resistenza per HIV è raccomandato a persone con infezione da HIV quando entrano in cura indipendentemente dall'inizio imminente o posticipato della terapia antiretrovirale (AIII). Se la terapia viene posticipata, la ripetizione del test al momento dell'inizio della terapia antivirale andrebbe considerata (CIII).
• Il test di resistenza per HIV dovrebbe essere effettuato per facilitare la selezione di farmaci attivi al momento del cambiamento del regime terapeutico in pazienti con fallimento virologico e livelli di HIV RNA > 1000 copie/ml (AI). In individui con > 500 ma < 1000 copie/ml, il test potrebbe non avere successo, ma dovrebbe comunque essere considerato (BII).
• Il test per la farmacoresistenza dovrebbe anche essere effettuato per la gestione della riduzione della carica virale subottimale (AII).
• Il test per la farmacoresistenza nel contesto di fallimento virologico dovrebbe essere effettuato mentre il paziente assume i farmaci antivirali prescritti o, se questo non è possibile, entro quattro settimane dopo l'interruzione della terapia (AII).
• Il test di resistenza genotipica viene raccomandato a tutte le donne in gravidanza prima dell'inizio della terapia (AIII) e per le donne in gravidanza con livelli di RNA HIV rilevabile durante la terapia (AI).
• Il test genotipico è raccomandato come test preferito per indirizzare la terapia in pazienti *"drug-naive"* e in pazienti con risposte virologiche subottimali o fallimento virologico durante il primo o il secondo regime terapeutico (AIII).
• L'aggiunta del test fenotipico a quello genotipico viene preferita generalmente per individui con *pattern* complessi di mutazioni associate a resistenza farmacologica, noti o sospetti, in particolare agli inibitori della proteasi (BIII).

Nel paziente *drug-naive* il test può documentare l'infezione con ceppi HIV con resistenza primaria e permette di ottimizzare la HAART, mentre in caso di fallimento virologico orienta la scelta dei farmaci ancora attivi

Utilizzo del test di resistenza nel paziente *"drug-naive"*

Il test di resistenza genotipico per HIV è raccomandato alle persone con infezione da HIV, appena entrano in osservazione (in infezione acuta o cronica), e a prescindere dall'inizio imminente o posticipato della terapia antivirale (2-4). Questo perché la trasmissione di ceppi HIV resistenti è ben documentata, ed è associata alla risposta virologica subottimale alla terapia antivirale iniziale (2, 4-6). Nel caso si debba iniziare la terapia in un individuo con infezione HIV acuta, il test di resistenza fornirà un aiuto immediato nel selezionare farmaci attivi per ottimizzare la risposta virologica. Se, invece, l'inizio della terapia è posticipato, il test di resistenza potrà divenire clinicamente utile al momento dell'inizio della terapia stessa. In questo caso, sarà poi utile ripetere il test prima dell'inizio della terapia antivirale, perché il paziente potrebbe aver acquisito un nuovo virus resistente ai farmaci (es. superinfezione).

Nel caso di paziente *naive* con infezione cronica, il test di resistenza è raccomandato perchè le mutazioni presenti al momento della trasmissione di HIV sono più stabili rispetto a quelle selezionate sotto pressione farmacologica (7).

Utilizzo del test di resistenza in caso di fallimento virologico

Il test di resistenza per HIV è raccomandato per facilitare la selezione di farmaci attivi al momento del cambiamento del regime terapeutico in pazienti con fallimento virologico e livelli di RNA virale > 1000 copie/ml. In individui con > 500 ma < 1000 copie/ml, il test potrebbe non avere successo, ma dovrebbe comunque essere considerato. Oramai, infatti, in diversi centri il test viene eseguito con successo e di *routine* anche a basse viremie e viene considerato informativo e riproducibile (8). Diversi studi hanno stimato l'utilità del test di resistenza (genotipica e/o fenotipica) nell'indirizzare la selezione dei farmaci antivirali in pazienti con fallimento virologico (9-10).

In generale, si è visto che la prima risposta virologica ai regimi di salvataggio è migliorata quando erano disponibili i risultati del test di resistenza per indirizzare cambiamenti di terapia, confrontati con le risposte osservate quando i cambiamenti di terapia erano impostati soltanto dal giudizio clinico.

Nuove classi, nuovi test di resistenza

Secondo le linee guida, l'utilità clinica del test di resistenza per gli inibitori dell'integrasi e dell'inibitore della fusione è limitata al momento, per la mancanza di farmaci di seconda linea all'interno di queste classi. In ogni caso, per pazienti in fallimento con inibitori dell'integrasi o della fusione, il test di resistenza per l'integrasi o gp41 è ritenuto utile per determinare le cause del fallimento virologico e per valutare se includere i farmaci di queste classi in regimi successivi.

Poco si sa ancora a riguardo della resistenza agli inibitori del CCR5. Al momento è raccomandato un test per la determinazione del tropismo corecettoriale ogni qualvolta venga preso in considerazione l'uso di un antagonista del CCR5. Inoltre, il test per il tropismo è consigliato per i pazienti in fallimento virologico all'antagonista del CCR5.

Utilizzo del test di resistenza per pazienti in gravidanza

Per fornire un'appropriata terapia alla madre e prevenire la trasmissione perinatale di HIV, l'uso del test di resistenza genotipica è raccomandato a tutte le donne in gravidanza prima dell'inizio della terapia e per quelle che sono all'inizio della gravidanza con livelli di HIV RNA rilevabile durante la terapia. Il test fenotipico potrebbe fornire informazioni ulteriori per donne che hanno complessi *pattern* di mutazioni di resistenza, in particolare agli inibitori della proteasi.

Le linee guida danno indicazioni sul ruolo, ancora limitato, del test di resistenza per gli inibitori della integrasi e della fusione e sull'uso ormai consolidato nelle donne in gravidanza

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. **Ceccherini-Silberstein F, Svicher V, Van Houtte M.** New horizons in resistance interpretation. *European Infectious Disease. 2009. June; 36-40.*
2. **Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, et al.** Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis. 2008; 47(2):266-285.*
3. **Hammer SM, Eron JJ, Reiss P, et al.** Antiretroviral treatment of adult HIV infection: recommendations of the International AIDS Society-USA panel. Schooley RT; International AIDS Society-USA. *JAMA 2008; 300 (5):555-70 (2008).*
4. **Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents.** Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. *Department of Health and Human Services.* http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf 2009.
5. **Little SJ, Holte S, Routy JP, et al.** Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. N Engl J Med. *2002; 347(6):385-394.*
6. **Kuritzkes DR, Lalama CM, Ribaudo HJ, et al.** Preexisting resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors predicts virologic failure of an efavirenz-based regimen in treatment-naive HIV-1-infected subjects. *J Infect Dis. 2008; 197(6):867-870.*
7. **Little SJ, Frost SD, Wong JK, et al.** Persistence of transmitted drug resistance among subjects with primary human immunodeficiency virus infection. *J Virol. 2008; 82(11):5510-5518.*
8. **Waters L, Mandalia S, Asboe D.** Successful use of genotypic resistance testing in HIV-1-infected individuals with plasma viraemia between 50 and 1000 copies/ml. *AIDS 2006; 20: 778-779.*
9. **Meynard JL, Vray M, Morand-Joubert L, et al.** Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure: a randomized trial. *AIDS. 2002; 16(5):727-736.*
10. **Wegner SA, Wallace MR, Aronson NE, et al.** Long-term efficacy of routine access to antiretroviral-resistance testing in HIV type 1-infected patients: results of the clinical efficacy of resistance testing trial. *Clin Infect Dis. 2004; 38(5):723-730.*

Maurizio Zazzi
Dipartimento di Biologia Molecolare, Policlinico Le Scotte, Università di Siena

Quale test di resistenza?

Dal confronto tra test fenotipico e genotipico emergono vantaggi e criticità sul loro utilizzo legati a tempi, costi, complessità e interpretazione del risultato

Fenotipo e Genotipo

I saggi per la valutazione della farmacoresistenza di una popolazione virale si basano sulla misurazione della suscettibilità ai farmaci da parte del virus in *vitro* (test fenotipici) ovvero sulla individuazione di specifiche mutazioni del genoma virale (test genotipici) (1) (Tabella 1).

Tabella 1 Caratteristiche ed applicazioni dei saggi di resistenze genotipici e fenotipici

Caratteristica	Test genotipico	Test fenotipico
Tempo di esecuzione	1-2 settimane	3-4 settimane
Costo	Contenuto	Elevato
Complessità	Medio-bassa (sistemi commerciali)	Elevata
Soglia di individuazione (% di mutante sul totale della popolazione virale)	~ 25%	~ 10%
Tipologia di risultato	Semiquantitativo (tipicamente categorie "sensibile", "intermedio", "resistente")	Quantitativo (rispetto a un ceppo sensibile di riferimento)
Interpretazione del risultato	Necessità di sistema interpretativo e/o parere esperto	Valutazione diretta (applicazione del valore soglia per il significato clinico)
Applicazione	Pratica clinica	Caratterizzazione del profilo di resistenza dei nuovi farmaci Casi con genotipo complesso e inconsueto nella pratica clinica
Aree di sviluppo futuro	Miglioramento soglia di individuazione Sistemi interpretativi esperti più accurati	Miglioramento soglia di individuazione?

I metodi fenotipici forniscono per definizione una misurazione quantitativa diretta ma la loro applicabilità su ampia scala è negativamente condizionata da costi elevati, difficoltà di standardizzazione, tempo di esecuzione prolungato e necessità di un livello di biosicurezza impegnativo. Inoltre per alcuni farmaci variazioni minime, difficilmente misurabili, dell'attività in *vitro* possono avere implicazioni rilevanti in termini di efficacia in *vivo*. I saggi genotipici devono la loro ampia diffusione come sistema di riferimento alla relativa facilità di esecuzione, soprattutto grazie alla disponibilità di *kit* commerciali certificati. In questo caso la parte più complessa si presenta però nella fase di interpretazione del dato analitico, quando il *pattern* di mutazioni individuato deve essere tradotto in indicazione di efficacia clinica dei vari antiretrovirali e delle loro combinazioni (2). Studi in *vitro* ed osservazioni in *vivo* forniscono la base per l'allestimento e l'aggiornamento di una serie di regole mediante le quali i vari sistemi interpretativi forniscono tale indicazione con una buona affidabilità. Aree di difficoltà per l'uso dei saggi genotipici sono rappresentate da (i) *pattern* mutazionali complessi ed inconsueti, soprattutto nel caso di farmaci alla resistenza nei confronti dei quali concorre un elevato numero di mutazioni (alta barriera genetica) e (ii) farmaci di recente introduzione nella pratica clinica, per i quali le informazioni di correlazione fra genotipo ed efficacia in *vivo* possono essere incomplete. In questi casi, l'utilizzazione di un saggio fenotipico può fornire indicazioni utili per la scelta della terapia.

Per superare le problematiche di analisi dei test genotipici, sono stati sviluppati sistemi interpretativi sempre più sofisticati, altamente attendibili e utili per la pratica clinica

Sistemi interpretativi del genotipo

Poiché la *routine* clinica si basa sui saggi genotipici, negli ultimi anni sono stati sviluppati sistemi interpretativi sempre più accurati (3). Al di là del continuo e proficuo aggiornamento dei sistemi basati su regole più utilizzati *(Stanford HIVdb, ANRS rules, Rega rules)*, la collaborazione fra infettivologi, virologi e bioinformatici ha portato ai primi prototipi di sistemi guidati dai dati. In questi ultimi, metodi *"machine learning"* apprendono da una grande mole di dati storici reali e forniscono un modello attraverso il quale è possibile predire con buona accuratezza la risposta ad un regime terapeutico. Poiché si valuta la risposta ad una combinazione di farmaci, piuttosto che a singoli antiretrovirali come negli algoritmi basati su regole, questi sistemi forniscono un supporto più orientato alla pratica clinica. Lo studio di questi modelli, in particolare nell'ambito della *Resistance Response Database Initiative* (4) *(www.hivrdi.org)* e del progetto *EuResist* (5) *(www.euresist.org)*, ha anche evidenziato che ulteriori informazioni specifiche del paziente, soprattutto la precedente storia terapeutica, possono essere utilizzate per migliorare l'accuratezza della previsione. Anche la considerazione di eventuali test genotipici precedenti (il cosiddetto genotipo "storico") può contribuire nella stessa direzione (6).

Verranno messi a punto sistemi esperti *online* e sviluppate nuove tecnologie molecolari per individuare mutanti farmacoresistenti

Sviluppi futuri

Il continuo aggiornamento dei test di resistenza accompagnerà l'utilizzazione dei nuovi farmaci recentemente introdotti e di quelli di prossima introduzione. Le principali linee di sviluppo interesseranno l'allestimento di sistemi esperti *on-line* in grado di considerare una serie di informazioni virologiche, cliniche e demografiche per una più accurata previsione dell'attività dei regimi terapeutici. Parallelamente il progresso nelle tecnologie molecolari consentirà una maggiore sensibilità nell'individuazione dei mutanti farmacoresistenti (7). L'insieme degli avanzamenti analitici ed interpretativi, coniugato alla disponibilità di trattamenti più efficaci e tollerabili, permetterà una più proficua gestione clinica dell'inevitabile fenomeno delle farmacoresistenze.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. **Zolopa AR.** Incorporating drug-resistance measurements into the clinical management of HIV-1 infection. *J Infect Dis. 2006; 194 Suppl 1:S59-64.*
2. **Van Laethem K, Vandamme AM.** Interpreting resistance data for HIV-1 therapy management--know the limitations. *AIDS Rev. 2006; 8:37-43.*
3. **Rhee SY, Fessel WJ, Liu TF, et al.** Predictive value of HIV-1 genotypic resistance test interpretation algorithms. *J Infect Dis. 2009; 200:453-63.*
4. **Larder B, Wang D, Revell A, et al.** The development of artificial neural networks to predict virological response to combination HIV therapy. *Antivir Ther. 2007; 12:15-24.*
5. **Rosen-Zvi M, Altmann A, Prosperi M, et al.** Selecting anti-HIV therapies based on a variety of genomic and clinical factors. Bioinformatics. *2008; 24:i399-406.*
6. **Zaccarelli M, Lorenzini P, Ceccherini-Silberstein F, et al.** Historical resistance profile helps to predict salvage failure. Antivir Ther. *2009; 14:285-91.*
7. **Le T, Chiarella J, Simen BB, et al.** Low-abundance HIV drug-resistant viral variants in treatment-experienced persons correlate with historical antiretroviral use. *PLoS One. 2009; 4:e6079.*

Resistenze e *fitness*

Massimo Andreoni
Cattedra di Malattie Infettive
Università di Roma,
Tor Vergata

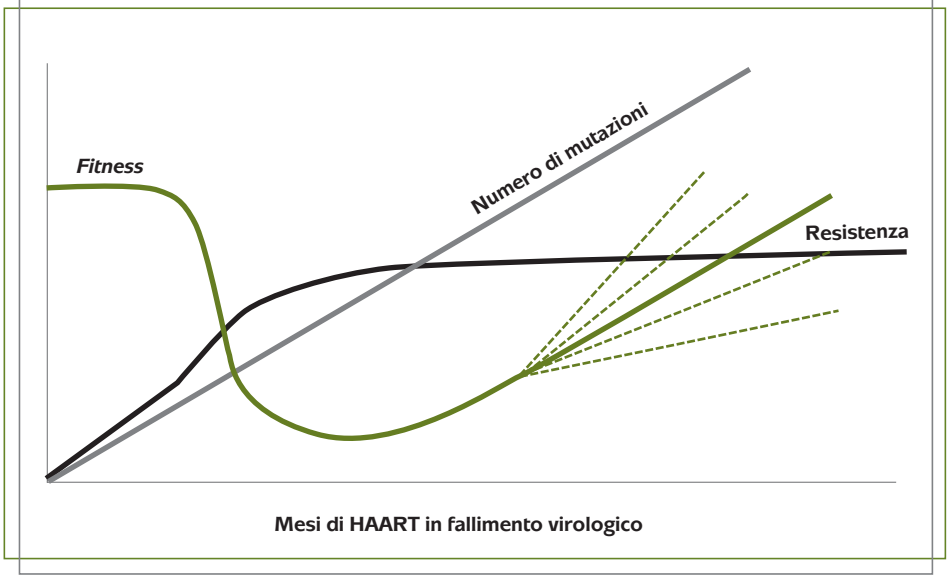
L'elevata variabilità intrinseca di HIV determina la frequentissima e naturale emergenza di mutazioni eventualmente capaci di determinare resistenza ai farmaci antiretrovirali. La selezione e persistenza di tali mutazioni in varianti virali dipende essenzialmente da due fenomeni: l'effetto che le mutazioni stesse esercitano sulla capacità replicativa del virus e l'eventuale pressione selettiva esercitata dai farmaci. In tal senso, con il termine di *fitness* virale, si intende la capacità replicativa di ceppi virali in un determinato microambiente.
Virus con mutazioni del genoma che determinino una sostanziale riduzione della *fitness* virale non riescono a replicarsi se posti in competizione con varianti virali selvagge non mutate *(wild type)* e, quindi, con migliore capacità replicativa. Varianti con ridotta *fitness* potranno, quindi, emergere soltanto nel caso in cui una pressione selettiva sia mantenuta da un farmaco in grado di impedire la replicazione di virus *wild type*.
Non tutte le mutazioni alterano in modo simile la *fitness* virale: per esempio, le mutazioni M184V e K65R (correlate alla resistenza agli NRTI) riducono drasticamente la capacità replicativa di HIV, mentre la mutazione K103N (correlata alla resistenza ad efavirenz e nevirapina) incide molto poco sulla *fitness* del virus. E' importante ricordare che virus mutati con ridotta *fitness* tendono nel tempo ad accumulare mutazioni dette secondarie, che sono compensatorie, in grado cioè di ripristinare le attività enzimatiche virali con un recupero della *fitness* a livelli alcune volte simili a quelle del virus *wild type*. In tal modo si possono venire a creare varianti virali non solo resistenti ai farmaci ma anche a capacità replicativa conservata (figura 1).
Le mutazioni secondarie in grado di ripristinare la *fitness* virale possono avvenire anche al di fuori del gene interessato dalle mutazioni di resistenza. Per esempio, mutazioni nel sito di clivaggio del gene *gag* sono in grado di migliorare la capacità replicativa di ceppi virali resistenti agli inibitori della proteasi con mutazioni nel gene *pol*.

L'utilizzo di farmaci che mantengono una pressione selettiva sul virus *wild type* favorisce l'emergenza di varianti virali con ridotta *fitness*, o capacità replicativa

Capacità replicativa e citopatogenicità virale

Il rapporto che esiste tra la capacità replicativa e la citopatogenicità virale ha importanti ripercussioni patogenetiche sull'evoluzione dell'infezione da HIV. Infatti, in pazienti trattati in fallimento virologico, la ridotta capacità replicativa del virus resistente è stata correlata con l'incremento significativo dei linfociti periferici CD4. Diversi meccanismi possono giustificare una risposta discordante viro-immunologica alla terapia antiretrovirale, l'immunità specifica nei confronti del virus può essere in grado di controllare, almeno in parte, la replicazione virale oppure un virus con ridotta capacità replicativa può spesso avere una ridotta citopatogenicità.
Su questa base, recentemente, sono state proposte terapie che utilizzano la pressione farmacologica per mantenere ceppi virali a bassa capacità replicativa e citopatogenicità. Per esempio, pazienti in fallimento virologico sono stati trattati in monoterapia con

Figura 1 Correlazione tra numero di mutazioni, resistenza e *fitness* virale



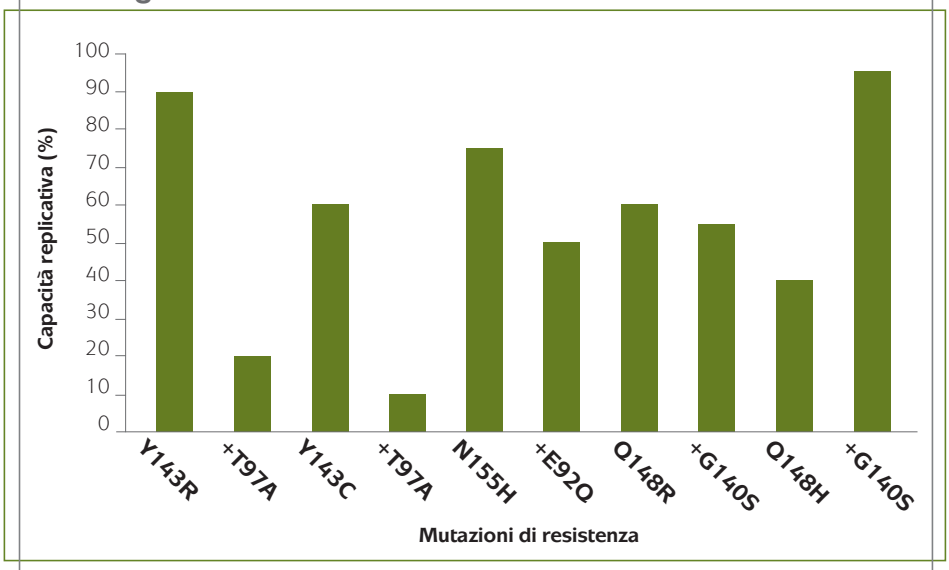
Per l'accumulo di mutazioni secondarie, compensatorie, che ripristinano le attività enzimatiche e recuperano la *fitness*, si possono creare varianti vitali non solo resistenti ai farmaci ma anche con capacità replicativa conservata

lamivudina o emtricitabina al fine di mantenere una pressione selettiva sulla mutazione M184V, che riduce sensibilmente la capacità replicativa virale, ottenendo una modesta riduzione dei linfociti CD4 e una perdita progressiva di altre mutazioni di resistenza.
Queste strategie che "utilizzano" la ridotta capacità replicativa virale devono essere oggi utilizzate nella pratica clinica in casi selezionati e comunque laddove non ci siano altre soluzioni terapeutiche che permettano un successo viro-immunologico.

Nuovi farmaci e mutazioni

Un argomento di grande attualità è l'effetto delle mutazioni di resistenza generate dai nuovi farmaci antiretrovirali sulla capacità replicativa di HIV. Dati presentati al CROI del 2009 hanno dimostrato che alcune mutazioni nel gene dell'integrasi che si generano in corso di terapia con raltegravir ed elvitegravir sono in grado di modificare significativamente la *fitness* virale. In particolare, la mutazione primaria di resistenza (Q148H) riduce la *fitness* virale che viene ripristinata dall'emergenza della mutazione secondaria (G140S) (figura 2). Per contro, in presenza di alcune mutazioni primarie (Y143R e N155H) in grado di ridurre significativamente la sensibilità virale agli inibitori dell'integrasi, la selezione di mutazioni secondarie (T97A e E92Q) riduce ulteriormente la capacità replicativa. Pochi sono a tutt'oggi i dati relativi alla persistenza delle mutazioni del gene dell'integrasi in assenza della pressione farmacologica anche se è ipotizzabile che alcune mutazioni, a basso impatto sulla *fitness*, possano essere mantenute per lunghi periodi di tempo e possano quindi essere facilmente trasmesse.
In generale comunque si deve ricordare che la capacità replicativa di virus con mutazioni di resistenza nella proteasi, e/o nella trascrittasi inversa e/o nella integrasi può essere difficilmente prevedibile per l'associarsi di mutazioni esterne al gene *pol* in grado di modificare la *fitness* virale .
Più interessante è la capacità replicativa di HIV in relazione al tropismo cellulare e, quindi,

Figura 2 Capacità replicativa di ceppi virali resistenti agli inibitori dell'integrasi



Fransen, CROI 2009

Alcune mutazioni nel gene dell'integrasi, che si generano nel corso delle terapie con raltegravir e elvitegravir, modificano in modo importante la *fitness* virale

all'eventuale selezione virale successiva all'uso di farmaci inibitori del CCR5. E' noto, ormai, da tempo che nella storia naturale della malattia uno *switch* da un virus R5 ad un virus *dual* tropico o X4 corrisponda alle fasi più avanzate dell'infezione caratterizzate da bassi livelli di linfociti CD4. Tale *switch* sembra essere correlato principalmente ad una selezione esercitata dal progressivo deterioramento dell'immunità piuttosto che da una maggiore patogenicità virale. In termini di trasmissibilità, seppur è dimostrato che il virus R5, per il suo spiccato tropismo per cellule monocito-macrofagiche, è principalmente coinvolto nell'infezione primaria, è stato dimostrato che anche il virus X4 può essere trasmesso.

Seppur con debite eccezioni, legate probabilmente a mutazioni sulla gp120 di HIV non ancora completamente riconosciute, si può affermare comunque che ceppi virali con tropismo X4 hanno una capacità replicativa maggiore rispetto a virus R5.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. **Croteau G, Doyon L, Thibeault D, et al.** Impaired fitness of human immunodeficiency virus type 1 variants with high-level resistance to protease inhibitors. *J Virol 1997; 71:1089-1096.*
2. **Back NK, Nijhuis M, Keulen W, et al.** Reduced replication of 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme. *EMBO J 1996; 15:4040-4049.*
3. **Clavel F, Race E, Mammano F.** HIV drug resistance and viral fitness. *Adv Pharmacol 2000; 49:41-66.*
4. **Domingo E, Escarmis C, Menendez-Arias L, et al.** Viral quasispecies and fitness variations. In: Domingo E, Webster R, Holland J, editors. Origin and evolution of viruses. *San Diego: Academic Press, 1999:141-161.*
5. **Buzon MJ, Dalmau J, Puertas MC, et al.** The HIV-1 integrase genotype strongly predicts raltegravir susceptibility but not viral fitness of primary virus isolates. *AIDS 2010, 24:17-25.*

Laura Milazzo
Azienda Ospedaliera Universitaria Luigi Sacco, Milano

Farmaci antivirali anti-HBV e farmacoresistenza

Le molecole anti-HBV, anche quelle in fase di studio, agiscono sulla polimerasi virale, determinando un elevato tasso di resistenze crociate

Nonostante il numero crescente di molecole antivirali attive sulla replicazione di HBV, esse condividono il medesimo bersaglio, rappresentato dalla polimerasi virale. Questo determina un elevato tasso di resistenze crociate tra i diversi farmaci impiegati, limitando, in ultima analisi, le possibilità delle terapie di seconda linea. Nella tabella 1 sono riportate le molecole attualmente registrate e quelle in fase II di studio, per il trattamento della epatite cronica da HBV, divise per classe di appartenenza.

Tabella 1 Classi e farmaci antivirali per l'epatite cronica B

Classe	Approvati	Posologia	Fase II
Analoghi nucleosidici	Lamivudina (LAM) Telbivudina (LdT) Emtricitabina Entecavir (ETV)	100 mg/die 600 mg/die 200 mg/die 0,5 - 1.0 mg/die	Elvucitabina Valtorcitabina Amdoxovir Racivir
Analoghi nucleotidici (fosfonati aciclici)	Adefovir dipivoxil (ADV) Tenofovir (TDF)	10 mg/die 245 mg/die	Alamifovir Pradefovir
Citochine	Interferon alfa Peg-IFN alfa	6.000.000 - 9.000.000 UI/ml 3 week 180 mcg/week	

Resistenza: quali i meccanismi?

Tra i fattori in grado di influenzare la comparsa di mutazioni associate a farmacoresistenza distinguiamo:

- fattori legati al virus
- caratteristiche dei farmaci antivirali
- caratteristiche legate all'ospite (tabella 2).

La *fitness* virale è l'abilità di un virus mutato, rispetto al virus nativo, di replicare in assenza del farmaco che lo ha selezionato. Solitamente i virus mutati hanno una minore capacità replicativa del virus *wild-type*, ma la continua esposizione alla barriera farmacologica induce la selezione di ulteriori mutazioni "compensatorie" in grado di restaurare la *fitness*.

La potenza antivirale di un farmaco è la rapidità con cui induce la soppressione della replicazione virale: tanto più rapida è la soppressione, tanto più remoto il rischio di sviluppare resistenza. Infine, la barriera genetica di un farmaco è rappresentata dal numero

Tabella 2 Fattori associati allo sviluppo di resistenza agli antivirali

Virali	• capacità replicativa *(fitness* virale*)*
Della molecola	• potenza • barriera genetica
Dell'ospite	• immunodepressione • obesità • aderenza • attività enzimatica di fosforilazione dei profarmaci

Fattori legati al virus, all'ospite e le stesse caratteristiche dei farmaci antivirali possono influenzare la comparsa di mutazioni associate a farmacoresistenza

di mutazioni necessarie al virus per replicare efficacemente in presenza di quel farmaco. Pertanto un'alta barriera genetica corrisponde a una bassa probabilità di sviluppo di resistenza.

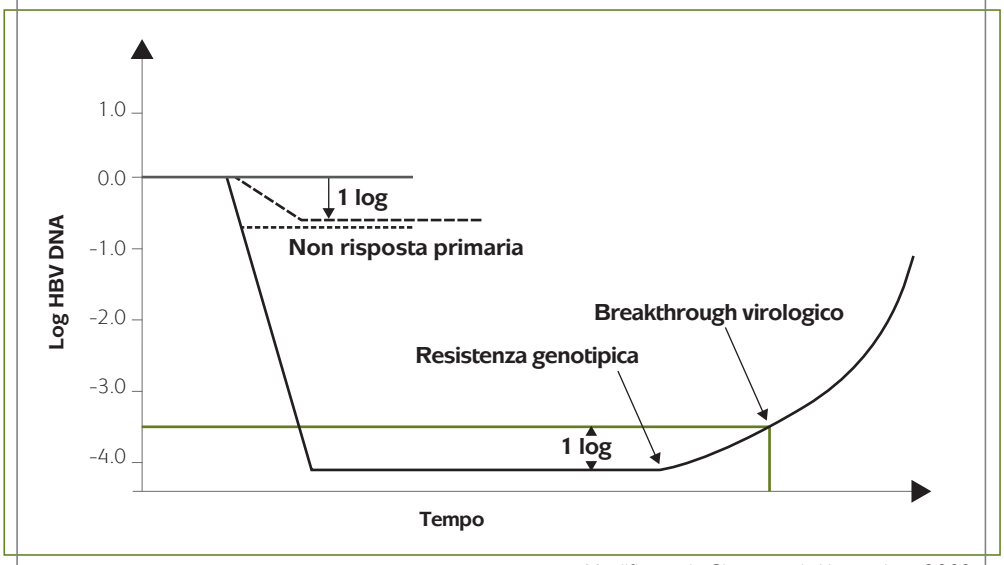
Fattori minori sono legati all'ospite: l'immunodepressione, favorendo alti livelli di replicazione virale, favorisce il tasso di insorgenza di mutazioni; l'obesità altera il volume di distribuzione dei farmaci riducendone le concentrazioni; la mancata aderenza è forse la maggiore causa di fallimento delle terapie antivirali; l'apparato enzimatico necessario alla attivazione intracellulare dei farmaci ne influenza l'efficacia.

Quali le conseguenze cliniche?

La resistenza ai farmaci antivirali può essere evidenziata e definita da un punto di vista clinico-virologico e confermata da analisi genotipiche e fenotipiche (figura 1).

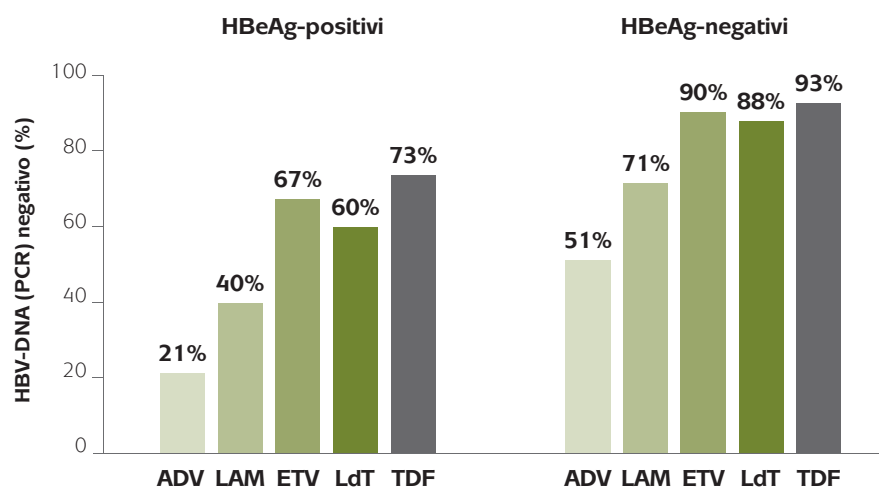
Nella pratica clinica si distinguono una **non-risposta primaria**, definita dalla mancata riduzione di HBV-DNA di almeno 1 $\log_{10}$ IU/mL entro i primi 6 mesi di trattamento e

Figura 1 Definizione di non risposta e fallimento alla terapia antivirale anti-HBV



Modificato da Ghany et al., Hepatology 2009

Figura 2 Efficacia dei farmaci anti-HBV a 1 anno



Se l'efficacia antivirale a breve termine è pressochè uguale per i vari farmaci anti-HBV, almeno per le molecole di più recente introduzione, è particolarmente variabile la frequenza di fallimento a medio e lungo termine

dovuta alla scarsa potenza del farmaco o alla presenza di polimorfismi degli enzimi di fosforilazione dell'ospite. A differenza di quanto osservato nell'infezione da HIV, non vi sono ad oggi evidenze di mutazioni di resistenza pre-esistenti al trattamento e responsabili di non risposta primaria.

Vi è poi il cosiddetto ***breakthrough*** **virologico**, definito da un aumento di HBV-DNA > 1 $\log_{10}$ IU/mL al di sopra del *nadir* in corso di trattamento dopo una iniziale risposta e talvolta seguito da ***rebound*** **virologico**, cioè un aumento dei livelli di HBV-DNA superiore ai valori pretrattamento. Sono i principali indicatori clinici dell'emergenza di resistenze antivirali.

Il ***breakthrough*** **biochimico**, cioè il rialzo delle ALT durante il trattamento dopo iniziale normalizzazione, è poco sensibile per la diagnosi clinica di resistenza virale, essendo tardivo rispetto al fallimento virologico.

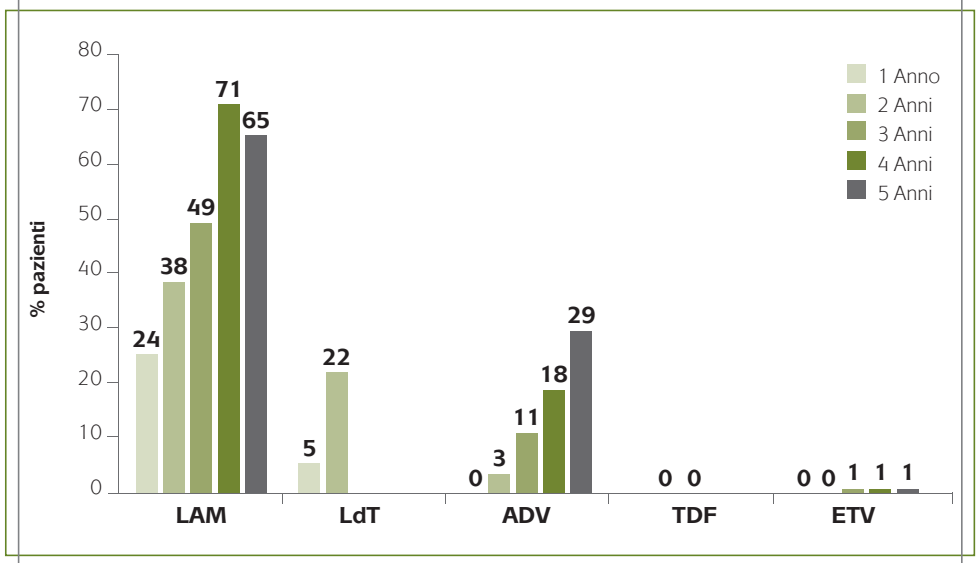
L'importanza di conoscere la frequenza con cui una molecola induce resistenza virale è dimostrata dalle ricadute cliniche in termini di efficacia nel tempo. Se infatti l'efficacia antivirale a breve termine è, almeno per le nuove molecole, poco dissimile, come dimostrato dalle percentuali di pazienti con negativizzazione della viremia di HBV a 1 anno dall'inizio della terapia (figura 2), il fallimento a medio-lungo termine è strettamente correlato alla probabilità di sviluppo di resistenze (figura 3).

Come monitorare il fenomeno "resistenza"?

La presenza di resistenza genotipica agli antivirali può essere evidenziata mediante la ricerca di mutazioni aminoacidiche sulla retrotrascrittasi virale, responsabili di indurre resistenza a specifici farmaci antivirali. L'accumulo di un numero crescente di mutazioni primarie e compensatorie è responsabile del fenomeno della *cross*-resistenza che determina l'inefficacia a più di un farmaco.

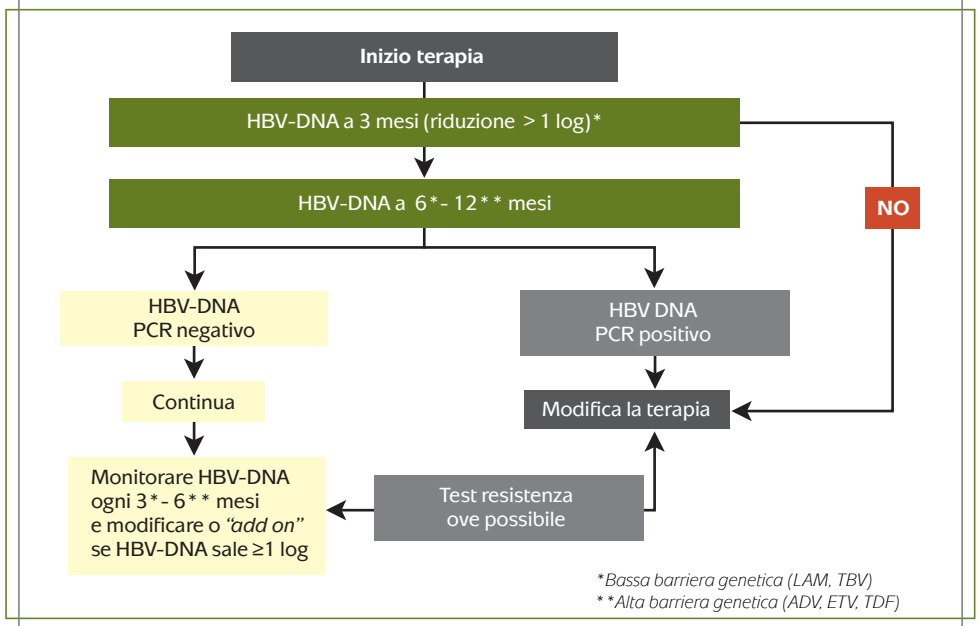
Nella gestione clinica non è richiesta l'esecuzione di un test di resistenza basale che preceda l'inizio della prima linea di trattamento anti-HBV (a causa del basso tasso di

Figura 3 Probabilità di sviluppare resistenza



Modificato da Ghany et al., Hepatology 2009

Figura 4 Algoritmo di trattamento del paziente in terapia con antivirali



EASL Guidelines, 2009

Il test di resistenza andrebbe eseguito in ogni paziente che presenti una risposta antivirale subottimale prima di modificare il regime in corso e in tutti i pazienti con *breakthrough* virologico/biochimico

mutazioni di resistenza nel soggetto non trattato e del dubbio significato clinico), mentre andrebbe eseguito in ogni paziente che presenti una risposta antivirale subottimale prima di modificare il regime in corso e in tutti i pazienti con *breakthrough* virologico/biochimico. I test di genotipizzazione non sono consigliati nel monitoraggio di *routine* del paziente; le Linee Guida raccomandano, però, il controllo periodico del-

Per prevenire l'emergenza di resistenza, la scelta nella prima linea di terapia dovrebbe cadere su molecole potenti ad elevata barriera genetica

Figura 5 Principali mutazioni di resistenza e strategie di gestione raccomandate nel paziente con resistenza genotipica

Farmaco	Mutazione di resistenza	Strategia raccomandata
Lamivudina	M204V/I; A181V/T	Aggiungere o passare a TDF Aggiungere ADV
Telbivudina	M204V/I	Aggiungere o passare a TDF Aggiungere ADV
Adefovir	A181V/T N236T	Sostituire con TDF o ETV Aggiungere LAM o LdT
Tenofovir	nessuna	?
Entecavir	L180M; M204V + I169T; M250V o T184G + S202I	Aggiungere o passare a TDF Aggiungere ADV

Da EASL Guidelines, 2009

l'HBV-DNA con metodo sensibile (PCR) a scadenza trimestrale fino alla negativizzazione della viremia e successivamente ogni 3-6 mesi in corso di trattamento, al fine di individuare precocemente i fallimenti virologici. In caso di rialzo dell'HBV-DNA oltre il *nadir* (> 1 $\log_{10}$ IU/mL), viene consigliata la ricerca di resistenze genotipiche, previa conferma della viremia a 1 mese di distanza. In figura 4 è riportato l'algoritmo del monitoraggio del paziente trattato con antivirali.

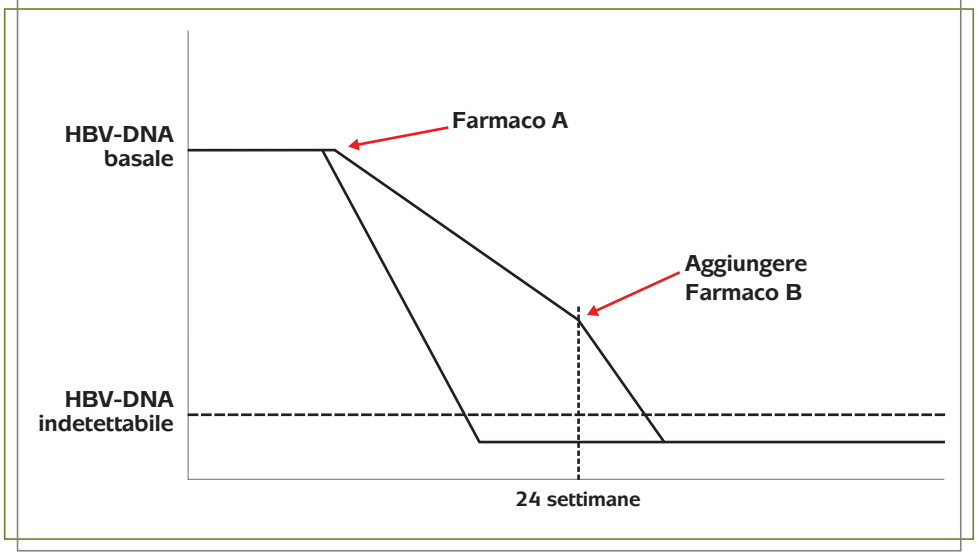
Gestione del paziente con resistenze ai farmaci antivirali

La figura 5 mostra la gestione della seconda linea di trattamento nei pazienti con resistenze genotipiche.

La migliore gestione dei mutanti resistenti è prevenire la loro emergenza. La scelta della prima linea di terapia dovrebbe cadere su molecole potenti e con alta barriera genetica quali entecavir o tenofovir; inoltre, in caso di resistenza, la terapia andrebbe cambiata il prima possibile, riducendo il rischio che si accumulino mutazioni. In presenza di resistenza alla lamivudina è stata individuata nella *early add-on therapy* la migliore strategia (figura 6).

E' stato dimostrato come individuare precocemente la ripresa della replicazione di HBV e intervenire aggiungendo un secondo farmaco, piuttosto che sostituirlo con un altro, ottenga risultati migliori nel prevenire l'emergere di ceppi multiresistenti. Inoltre nuovi

Figura 6 Principio della *very early add-on therapy*



Con l'aggiunta di un secondo farmaco si ottengono risultati migliori nel prevenire l'emergenza di ceppi resistenti

studi puntano sulla associazione in prima linea di 2 molecole al fine di prevenire l'emergere di resistenze. I primi dati disponibili appaiono promettenti, ma il beneficio di regimi di associazione rispetto alle monoterapie con farmaci ad alta barriera genetica, così come il rischio di competizione farmacologia sul bersaglio comune, richiedono ulteriori studi.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. **Ghany MG, Doo EC.** Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology 2009; 49:S174-84.*
2. **Terrault NA.** Benefits and risks of combination therapy for hepatitis B. *Hepatology 2009; 49:S122-28.*
3. **Carosi G, Rizzetto M.** Treatment of chronic hepatitis B: reccomendations from an Italian Workshop. *Dig Liv Dis 2008; 40(8):603-17.*
4. **EASL.** EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol 2009; 50:227-42.*
5. **Lai CL, Gane E, Liaw YF, et al.** Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med 2007; 357:2576_88.*
6. **Chang TT, Gish RG, de Man R.** A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med 2006; 354:1001-10.*
7. **Lampertico P.** Partial virological response to nucleos(t)ide analogues in naïve patients with chronic hepatitis B: From guidelines to field practice. *J Hepatol 2009; 50:644-7.*

Mario Rizzetto
Azienda Ospedaliera Universitaria San Giovanni Battista, Torino

Linee guida HBV: aggiornamento 2009

La filosofia su cui si sono basate le Linee Guida Italiane è stata quella di bilanciare l'efficacia dei farmaci con i rischi che la terapia comporta nel contesto clinico del singolo paziente

L'avvento negli ultimi anni di antivirali di sintesi contro il virus dell'epatite B (HBV) ha cambiato lo scenario terapeutico dell'epatite B (EB); pertanto le Società Scientifiche competenti hanno convocato a Stresa nel 2007 una Conferenza di Consenso sulla terapia della malattia, il cui pronunciamento è stato licenziato alla stampa nel 2008.
Il Consenso Italiano ha ribadito che nei due scenari virologici/epidemiologici dell'EB, quello minoritario HBeAg-positivo e quello predominante HBeAg-negativo, sono disponibili due diverse strategie terapeutiche:

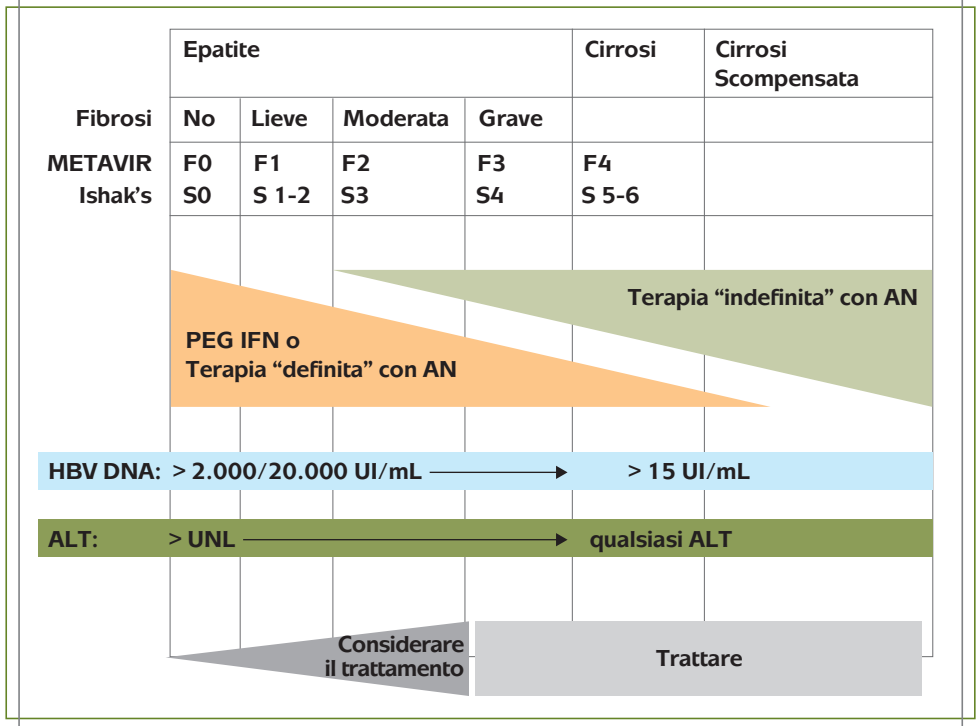
- l'Interferone peghilato (Peg-IFN), terapia parenterale, di durata finita, d'efficacia limitata, risolutiva nei pazienti HBeAg positivi una volta raggiunta la sieroconversione ad anti-HBe, scevra dal rischio di suscitare resistenze, ma aggravata da effetti collaterali importanti;
- gli antivirali di sintesi, terapia orale di durata limitata solo nei pazienti HBeAg positivi che sieroconvertono ad anti-HBe, di durata illimitata in tutti gli altri, non risolutiva ma molto efficace nel contenere la replicazione virale e la malattia, scevra da effetti collaterali ma gravata dal rischio di suscitare resistenze col perdurare della terapia.

La filosofia su cui si sono basate le Linee Guida Italiane è stata quella di bilanciare l'efficacia dei farmaci con i rischi che la terapia comporta nel contesto clinico del singolo paziente; è stato considerato prioritario non aggravare la situazione clinica con gli effetti collaterali dell'IFN e non compromettere la risposta terapeutica agli antivirali con l'emergenza di mutanti dell'HBV che, oltre a divenire resistenti alla terapia in atto ed a ricapitolare la malattia, possono diminuire o vanificare la risposta terapeutica ad altri antivirali per resistenze crociate.
Il paradigma di Stresa (figura 1) riassume i capisaldi terapeutici:

- considerare o raccomandare la terapia con Peg-IFN in contesti clinici stabili; seppure il paziente ha limitate probabilità di risposta, se non risponde non residuano conseguenze cliniche o alterazioni genetiche dell'HBV ed il paziente può essere risottoposto a terapia con antivirali sintetici;
- raccomandare la terapia antivirale in contesti clinici di malattia avanzata dove l'efficacia dell'antivirale può recuperare spazio clinico e dove il rischio di resistenza diventa il male minore a fronte di una prognosi infausta nel breve termine; tuttavia di non usare l'antivirale o usarlo con prudenza dove l'impegno terapeutico è verosimilmente per tempi lunghi, tale da permettere l'emergenza di resistenza.

In maggior dettaglio, le Linee Guida Italiane raccomandano di usare in prima linea il Peg-IFN nella forma stabile HBeAg-positiva, di considerare il solo Peg-IFN nelle forme HBeAg negative iniziali (fibrosi in istologia minore di S 3), di usare il Peg-IFN o gli antivirali nelle forme intermedie fino alla cirrosi compensata, la malattia avanzata essendo appannaggio dei soli antivirali.

Figura 1 **Il paradigma di Stresa**



Carosi G, Rizzetto M., Dig Liver Dis 2008

Le Linee Guida Italiane raccomandano di usare in prima linea il Peg-IFN nella forma stabile HBeAg-positiva, di considerare il solo Peg-IFN nelle forme HBeAg negative iniziali, di usare il Peg-IFN o gli antivirali nelle forme intermedie fino alla cirrosi compensata

Quanto ai singoli antivirali, le Linee Guida formulate nel 2007 hanno considerato quelli allora disponibili, cioè la lamivudina, l'adefovir, l'entecavir e la telbivudina.
La raccomandazione è stata di non usare più la lamivudina in monoterapia per lunga durata, ma di riservarla a trattamenti brevi o in combinazione.
Le priorità sono state stabilite tenendo conto del bilancio fra efficacia dei farmaci, loro effetti collaterali e barriera genetica; conseguentemente è stata data indicazione prioritaria all'entecavir (alta efficacia, alta barriera genetica) e quindi all'adefovir (efficacia più ridotta, buona barriera genetica); l'uso della telbivudina (alta efficacia, bassa barriera genetica) è stato limitato ai pazienti con carica virale ridotta ($\leq 2 \times 10^7$ UI/ml se HBeAg +; $< 2 \times 10^6$ UI/ml se HBeAg-).
Nel 2008 è divenuto disponibile anche il tenofovir, antivirale in uso da anni nell'infezione da HIV, ma approvato solo recentemente per la terapia dell'Epatite B; donde la necessità di rivedere le linee guida per inserire il nuovo venuto nello scenario terapeutico contemporaneo.

Nell'aggiornamento delle linee guida, tenofovir è stato posizionato al pari di entecavir con le stesse indicazioni e priorità

Il consenso riconvocato nel 2009 ha preso atto dai dati di letteratura ben consolidati che il tenofovir presenta efficacia elevata e alta barriera genetica, almeno per i due/tre anni di terapia continuativa in cui ha dato prova di sé. Il farmaco è stato dunque posizionato alla pari dell'entecavir, con le stesse indicazioni e con le stesse priorità.
Poiché il tenofovir è partecipe della classe dei nucleotidi ed è analogo all'adefovir, ma di questo è più potente e di più alta barriera genetica, e poiché i nucleotidi rappresentano l'unica alternativa per i pazienti che sviluppano resistenza ai nucleosidi (lamivudina, entecavir, telbivudina), tenofovir è stato preferito ad adefovir come farmaco di recupero nei pazienti in cui i nucleosidi hanno suscitato resistenza.
Tuttavia tenofovir sembra potenzialmente più a rischio degli altri antivirali nei suoi effetti nefrotossici e nei confronti dei pazienti con danno osseo.
Gli esperti hanno preso atto che la Ditta Gilead, produttrice del farmaco, impone il monitoraggio della funzione renale in modo più stringente di quanto sia stato finora richiesto per gli altri antivirali e richiama l'attenzione al rischio del farmaco in situazione di alterato metabolismo dell'osso. L'estensione di queste impegnative precauzioni alle Linee Guida è stato un atto dovuto, nonostante gli studi registrativi dedicati all'HBV non abbiano dimostrato alcun rischio nefrotossico od osseo in eccesso, essendo tali precauzioni estrapolate dalla precedente esperienza in un altro contesto clinico, forse non omologabile, quello dell'HIV; l'attesa è che il monitoraggio dei pazienti con HBV trattati con tenofovir dica se le precauzioni sono motivate o meno e, se motivate, quale sia il rischio reale nei pazienti con epatite B.
Correzioni marginali sono state l'introduzione della non-determinabilità (con i test più sensibili attualmente disponibili) dell'HBV-DNA sierico come unico criterio che esclude la terapia nel paziente cirrotico (al posto del precedente *cut-off* di ≤ 200 UI/ml) e l'omissione nella diagnostica dell'anticorpo IgM contro l'antigene core dell'HBV (IgM anti-HBc), per uniformità con le altre linee guida internazionali che considerano solo l'HBV-DNA come indice di attività virale.
Infine, sono stati meglio precisati i criteri di risposta nei pazienti immunocompetenti e più dettagliate le indicazioni profilattiche negli immunodepressi.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI
1. **Carosi G, Rizzetto M.** Treatment of chronic hepatitis B: reccomendations from an Italian Workshop. *Dig Liver Dis 2008; 40 (80):603-17.*

Pratica clinica:
esperienze "sul campo" commentate dagli esperti

ReAd files ospita una nuova sezione, dedicata alla presentazione, alla discussione e al commento di casi clinici particolarmente interessanti e emblematici di pazienti con infezione da HIV e da virus epatitici.
"Da più di 10 anni, commenta il professor **Mauro Moroni**, ReAd files arriva negli studi di Medici Infettivologi e di quanti collaborano per la miglior assistenza alle persone HIV-positivo. Ogni edizione della rivista affronta un numero limitato di temi, approfonditi da esperti e rubriche collaterali finalizzate all'aggiornamento del Medico in tempo reale.
Con questa nuova rubrica, ReAd files intende aprirsi ai problemi che gli Infettivologi affrontano ogni giorno nell'ambito di quella "zona grigia" di interrogativi clinici cui nessuna Linea Guida è in grado di dare risposte. ReAd files ritiene che la messa in comune dei problemi del singolo e delle strategie seguite, sia uno strumento valido ed efficace di crescita in esperienze e cultura.
Oltre al valore di aggiornamento scientifico, il commento del caso clinico, a firma di un membro del Comitato di Redazione o del Comitato Scientifico di ReAd files, offre un valore aggiunto importante alla criticità della discussione.
Pubblichiamo su questo numero la presentazione di un caso che tratta di una problematica comune nella pratica clinica infettivologica, che ha richiesto però, una complessa interpretazione diagnostica, con il commento critico di un membro del Comitato Scientifico. Sui prossimi numeri pubblicheremo i lavori che ci perverranno direttamente dagli autori."

Pubblicazione e premiazione dei migliori lavori pervenuti
I migliori 4 casi clinici selezionati dal Comitato di Redazione ReAd Files saranno pubblicati sui numeri 2-3-4 nell'anno 2010 e sul primo numero dell'anno 2011.
Oltre alla pubblicazione, gli autori dei casi selezionati saranno premiati con un *grant* pari a € 1.500 lordi per ciascun lavoro.
I casi clinici selezionati e pubblicati saranno presentati dagli autori in occasione del **9° Congresso Nazionale SIMIT** (Ergife Palace Hotel - Roma, 24-27 novembre 2010). Per i vincitori è prevista inoltre l'iscrizione gratuita al Congresso.

Norme per gli autori e requisiti redazionali
Vengono richiesti agli autori casi clinici emblematici di pazienti con infezione da HIV e da virus epatitici.
Ogni caso clinico dovrà prevedere:

1 - **breve presentazione del caso e storia clinica/anamnesi**
2 - **evoluzione del caso/scelte cliniche e terapeutiche adottate e commentate dal clinico**
3 - **considerazioni conclusive**

Nella stesura del caso clinico, l'autore dovrà attenersi alle seguenti indicazioni redazionali:
- testo: **complessivamente circa 3000 battute**
- bibliografia: **max 5 referenze**
- iconografia a supporto: **indicativamente 1-3 grafici/tabelle ad esempio relativi all'andamento viro-immunologico, esami biochimici o altri esami, imaging, etc…**

Non sono previsti limiti di età per la presentazione del lavoro.
La sottomissione e l'eventuale pubblicazione del caso non preclude la sua sottomissione e pubblicazione su riviste internazionali.

Marco Franzetti
Dipartimento di Scienze Cliniche, Sezione di Malattie Infettive e Immunopatologia Ospedale "L. Sacco", Università di Milano

Un caso complesso di meningite tubercolare

Al paziente, che presenta importanti sintomi neurologici, viene riscontrata la positività per TB, con PCR sul liquido cerebrospinale positivo, e per HIV-1; vengono impostate la ARV e la terapia antitubercolare

Nel novembre 2009 un uomo di 63 anni, seguito per infezione da HIV-1 e noto per una pregressa meningite tubercolare, si presentava riferendo scotomi fugaci, senza deficit neurologici focali.

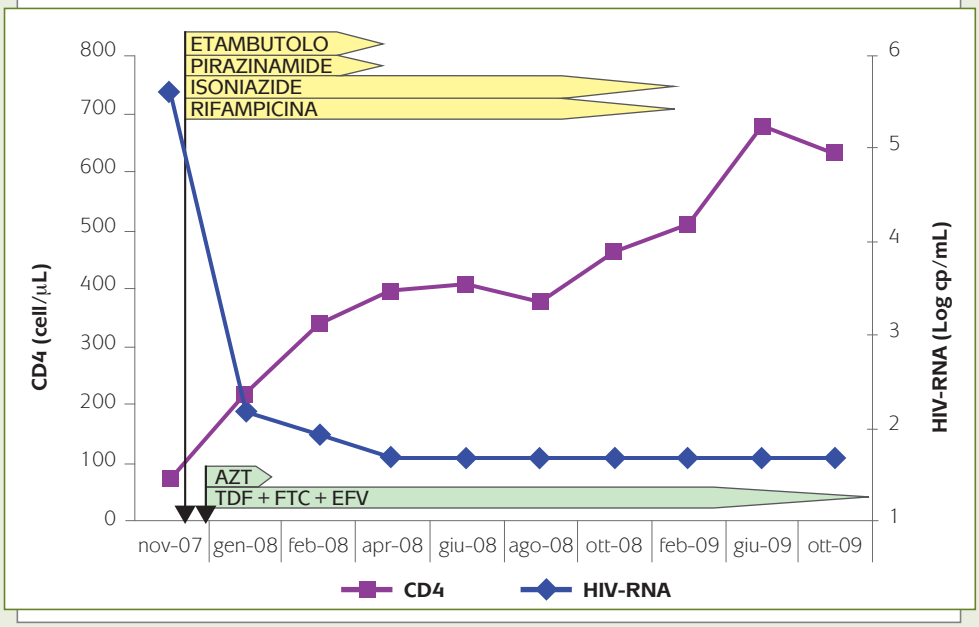
Diagnosi e storia terapeutica

La diagnosi di infezione da HIV-1 (HIV-RNA 418.136 cp/mL e CD4+ 71 cell/μL) era stata posta nel novembre del 2007 nel corso di un ricovero per iperpiressia, rallentamento psicomotorio e allucinazioni, con progressiva alterazione dello stato di coscienza in assenza di *rigor nucalis*. Le indagini neuroradiologiche (TAC e RMN con mezzo di contrasto) rilevavano unicamente una modesta atrofia corticale, l'intradermoreazione tubercolinica risultava positiva e alla rachicentesi eseguita in data 19.11.07 si riscontravano ipoglicorrachia e iperprotidorrachia con minima pleiocitosi linfocitaria. Sulla base del quadro liquorale, si introduceva terapia con isoniazide, rifampicina, etambutolo e pirazinamide; le indagini microbiologiche per batteri, micobatteri e funghi condotte su liquido cerebrospinale (CSF) risultavano negative, mentre la PCR per *Mycobacterium tuberculosis complex* (frammento IS6110) dava esito positivo.
In considerazione dei valori elevati di HIV-RNA (HIV-RNA 157.050 cp/mL) riscontrati su CSF, in data 29.11.07, dopo esecuzione di test genotipico di resistenza che indicava un ceppo sensibile a tutti i farmaci antiretrovirali, si introduceva terapia con tenofovir, emtricitabina ed efavirenz, associati inizialmente a zidovudina per via endovenosa. Le condizioni cliniche e le rachicentesi di controllo mostravano un rapido miglioramento e il paziente veniva dimesso, proseguendo la terapia antitubercolare invariata per tre mesi. Successivamente assumeva isoniazide e rifampicina fino all'ottobre 2008, quando per la completa risposta clinica, ad undici mesi dal suo inizio si sospendeva la terapia antitubercolare.
Il recupero immunologico risultava rapido e associato a riduzione della viremia plasmatici che si manteneva costantemente non rilevabile a partire dal marzo 2008 (figura 1); il paziente rimaneva asintomatico al *follow up*.

Iter attuale

Nel novembre 2009, per la sintomatologia precedentemente indicata, il paziente veniva sottoposto a *fundus oculi,* che risultava nella norma e a RMN encefalo che mostrava, invece, la presenza di plurime lesioni tondeggianti, la maggiore delle quali localizzata in sede frontale destra (figura 2). L'esame obiettivo neurologico era completamente negativo e gli esami ematochimici risultavano nella norma.
L'iter diagnostico prevedeva l'esecuzione di rachicentesi che non mostrava alterazioni all'analisi chimico-fisica del CSF; gli esami microbiologici colturali per batteri, micobatteri e funghi, così come quelli biomolecolari diretti nei confronti di HSV, VZV, JCV, EBV, CMV, *T. gondii, M. tuberculosis* risultavano negativi. Per escludere un secondarismo neoplastico si eseguiva

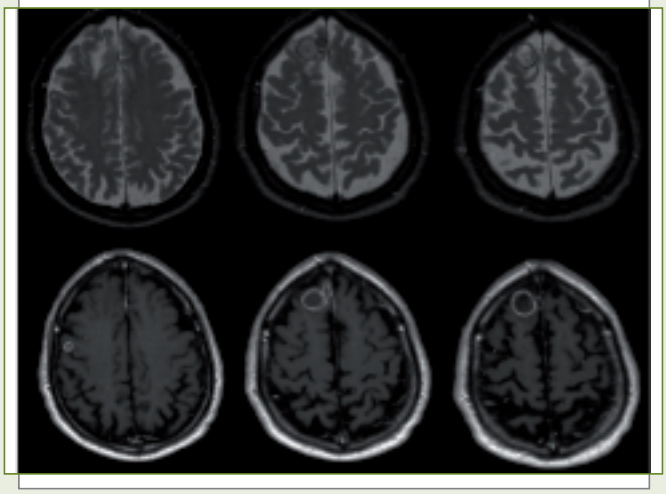
Figura 1 **Andamento della conta dei linfociti T CD4+ (cell/mL) e della viremia plasmatica (cp/mL)**



Alla RMN, eseguita per il persistere della sintomatologia, si evidenzia la presenza di lesioni plurime tondeggianti

PET *total body*, che rilevava una incrementata fissazione del tracciante a livello dei linfonodi del cavo ascellare sinistro. Veniva effettuata escissione chirurgica di un linfonodo che, all'analisi istologica, mostrava un quadro compatibile con linfadenite reattiva HIV-correlata. In data 13/1/10 si procedeva, pertanto, presso l'U.O. di Neurochirurgia dell'Ospedale di Legnano alla esecuzione di biopsia cerebrale; dopo incisione della dura, si procedeva all'asportazione di una formazione nodulare gommosa, delle dimensioni di 1,5 cm localizzata pochi millimetri al di sotto della corteccia cerebrale; l'esame istologico documentava la presenza di un quadro di meningo-encefalite granulomatosa gigantocellulare necrotizzante (figura 3); all'indagine microscopica risultava negativa la ricerca di bacilli acido-alcool resistenti (con la colorazione di Ziehl-Neelsen) mentre la colorazione Tb-fluoro con auramina-rodamina e la PCR per M. tuberculosis erano positivi. Si reintroduceva pertanto terapia con isoniazide, rifampicina, etambutolo e pirazinamide, in attesa di conferma all'esame colturale (negativo a 40 giorni) e della definizione della sensibilità ai singoli agenti antimicobatterici.

Figura 2 **RMN encefalo con mezzo di contrasto (6/11/2009)**



Come interpretare questo dato?

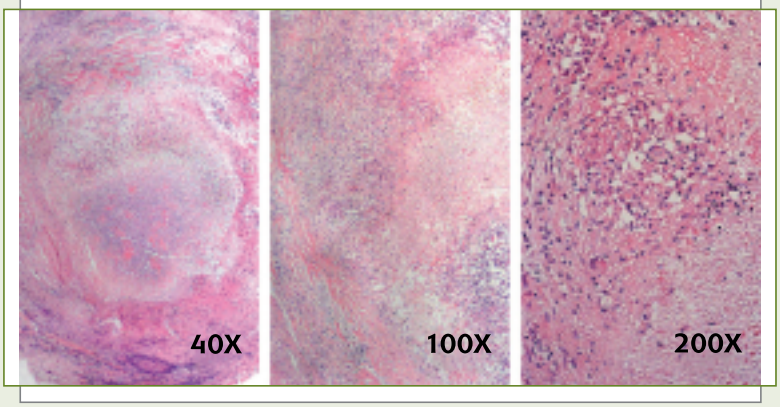
Il caso segnalato appare peculiare e di non univoca interpretazione e solleva numerosi quesiti. A distanza di 13 mesi da un episodio di meningite tubercolare apparentemente risoltosi e con

Il risultato della biopsia cerebrale documenta la presenza di un quadro di meningo-encefalite granulomatosa gigantocellulare necrotizzante

una situazione immunovirologica ottimale (linfociti CD4+ 640 cell/mL, HIV-RNA < 50 cp/mL), a seguito di terapia ARV efficace il paziente descritto ha presentato una modesta sintomatologia clinica (scotomi fugaci). A fronte di questa, il reperto neuroradiologico appariva, invece, eclatante e ha imposto un iter diagnostico complesso e invasivo. L'interpretazione diagnostica è ulteriormente complicata da alcuni dati istomicrobiologici apparentemente contrastanti; infatti, l'esame microscopico in fluorescenza con colorazione auramina-rodamina e le indagini biomolecolari condotte sul frammento anatomico ottenuto durante la biopsia risultavano positivi per *M. tuberculosis* mentre la colorazione di Ziehl-Neelsen e la coltura (a 40 giorni) erano negative. L'esame istologico condotto presso la Anatomia Patologica dell'Ospedale "L. Sacco" mostrava la presenza di granulomi gigantocellulari con Ziel-Neelsen negativa.

La negatività degli esami colturali, il quadro istologico e neuroradiologico osservati e il rapido e significativo recupero immunologico potrebbero inquadrare il processo patologico come una sindrome infiammatoria da immunoricostituzione (IRIS) con una presentazione tardiva rispetto ai casi documentati in letteratura, pur non rispettando il criterio temporale della definizione di caso, che prevede un esordio entro tre mesi dall'inizio della terapia HAART (1, 2).

Figura 3 Biopsia cerebrale (13/01/10): colorazione mediante ematosilina-eosina, a diversi ingrandimenti: granulomi meningei con necrosi e cellule giganti



In alternativa, il quadro neuroradiologico potrebbe essere interpretato come una riattivazione da imputare ad un trattamento antitubercolare solo parzialmente efficace per problemi di resistenza o di ridotta penetrazione dei farmaci nella sede di infezione. L'assenza di un isolato microbiologico nel caso dell'episodio iniziale (e quindi del relativo antibiogramma) non permette di escludere una possibile resistenza ai farmaci anche se il rapido e progressivo miglioramento del quadro clinico depongono a sfavore di tale ipotesi.

In assenza di una indicazione univoca delle linee guida sulla durata del trattamento in corso di meningite tubercolare, allo scopo di ridurre il rischio di recidiva, è probabilmente opportuno preferire una durata più prolungata della terapia specifica (> 1 anno) (3).

Il caso riportato, infine, potrebbe suggerire la necessità di effettuare un monitoraggio mediante *imaging* neuro-radiologico in corso di meningite tubercolare, nonostante una risposta ottimale alla TARV, associata ad una apparente risposta clinica alla terapia antitubercolare e pur in assenza di precedenti lesioni encefaliche.

I riscontri diagnostici confermano, inoltre, la validità della PCR nella diagnosi differenziale in corso di patologia neurologica tubercolare (4). Da ultimo, il caso presentato conferma la difficoltà dell'interpretazione dei reperti neuroradiologici particolarmente nei soggetti con infezione da HIV e l'utilità in casi selezionati dell'impiego di una indagine invasiva, quale la biopsia cerebrale.

Il commento

*A cura del Dottor **Fredy Suter**, U.O. Malattie Infettive, Bergamo*

Problematiche e quesiti relativi a questo caso sono ampiamente dettagliati nella discussione. Mi limiterò, quindi ad approfondire alcuni aspetti specifici senza la pretesa di risposte risolutive. Non sono in discussione la diagnosi iniziale di meningite tubercolare e successivamente di tubercolomi cerebrali multipli. In particolare, i tubercolomi sono certi sulla base dei riscontri istologici, batterioscopici e del test di amplificazione genica (PCR). La lettura dei preparati con fluorocromi richiede un microscopio a fluorescenza ed una speciale esperienza dell'operatore, ma comporta una sensibilità maggiore rispetto ad altre colorazioni tradizionali, in quanto consente di utilizzare ingrandimenti minori e quindi di visualizzare più facilmente estese aree di tessuto (C.L.S.I. Laboratory detection and identification of Mycobacteria; proposed guidelines, 2007). Non mi sembra, invece, definibile con certezza il momento in cui i tubercolomi si sono formati macroscopicamente, poichè il manifestarsi di sintomi poco specifici quali gli scotomi non è necessariamente indicativo di insorgenza recente. Se si accetta l'ipotesi che i granulomi siano insorti precocemente allora è possibile invocare, in termini patogenetici, sia una componente legata alla immunoricostituzione, sia una reazione paradossa ai farmaci. Entrambe, infatti, si osservano nei primi mesi rispetto all'inizio della HAART o della terapia antitubercolare. Circa il trattamento della meningite tubercolare, la scelta dei farmaci, in assenza di un isolamento del micobattere e quindi di un antibiogramma, appare condivisibile anche se non esistono trials controllati al riguardo. A posteriori, come è stato sottolineato, sarebbe stato ragionevole continuare la terapia più a lungo. Sulla durata ottimale della terapia non esistono certezze nei pazienti sieronegativi e ancor meno nei sieropositivi: periodi di 12 mesi sono in genere ritenuti sufficienti, con proposte di terapie di solo 6 mesi o di trattamenti prolungati per anni (3-4). Sarà, ovviamente, interessante seguire l'evoluzione dei tubercolomi dopo la reintroduzione dei farmaci specifici. Mi chiedo, infine, se possa essere utile una terapia steroidea associata.

Ringraziamenti

Ringrazio i colleghi delle Unità Operative di Malattie Infettive, Neurochirurgia, Anatomia Patologica e Microbiologia dell'Ospedale Civile di Legnano e il Dr. Carlo Parravicini, Unità Operativa di Anatomia Patologica dell'Ospedale "L. Sacco" per la collaborazione fornita, il Dr. Mario Corbellino e il Prof. Spinello Antinori della Sezione di Malattie Infettive e Immunopatologia del Dipartimento di Scienze Cliniche Ospedale "L. Sacco" dell'Università di Milano per la revisione critica del lavoro.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. **Pepper DJ, Marais S, Maartens G, et al.** Neurologic Manifestations of Paradoxical Tuberculosis-Associated Immune Reconstitution Inflammatory Sindrome: A Case Series. *Clin Infect Dis 2009; 48: 96-107.*
2. **Marais S, Scholtz, Pepper DJ, et al.** Neuroradiological features of the tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *Int J Tuberc Lung Dis 2010; 14:188-196.*
3. **Thwaites G, Fisher M, Hemingway C, et al.** British Infection Society guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of the central nervous system in adults and children. *J Infect 2009; 59: 167-187.*
4. **Rock RB, Olin M, Baker CA, et al.** Central Nervous System Tuberculosis: Pathogenesis and Clinical Aspects; *Clin Microbiol Rev 2008; 21: 243-261.*

Update dal laboratorio

HIV

All'approfondimento delle metodiche per il test per la valutazione della farmacoresistenza di HIV-1 è dedicato questo inserto delle "pagine gialle" del laboratorio, a cura delle dottoresse **Valeria Micheli** e **Michela Violin**, dell'Ospedale Sacco di Milano.

FARMACORESISTENZA DI HIV-1: I TEST DI LABORATORIO

La farmacoresistenza di HIV-1

La conoscenza del profilo di suscettibilità delle varianti virali presenti nel paziente HIV1-infetto è un requisito fondamentale per l'impostazione ottimale della terapia antiretrovirale (1). Per tale ragione, il test di resistenza è ormai diventato parte integrante della pratica clinica nella gestione del paziente HIV1-infetto (2). Oltre alle informazioni relative al livello di suscettibilità ai farmaci antiretrovirali della specie virale predominante di un soggetto, il test di resistenza consente di studiare il fenomeno della trasmissione di ceppi resistenti, stabilire le cause del *rebound* virale, monitorare l'emergenza di mutazioni di resistenza e il fenomeno della *cross*-resistenza di classe.

Attualmente esistono due approcci distinti per la determinazione della farmaco resistenza, l'approccio fenotipico, mediante misurazione diretta della suscettibilità ai farmaci antiretrovirali in *vitro*, e l'approccio genotipico, mediante rilevazione delle mutazioni nel genoma virale che sono associate alla farmacoresistenza. Il test VirtualPhenotype™-LM (Virco; Mechelen, Belgio) rappresenta una sorta di interpretazione del fenotipo sulla base del genotipo.

Test Fenotipici

I saggi fenotipici valutano la crescita in *vitro* di isolati virali coltivati in presenza di concentrazioni crescenti di farmaci rispetto al virus *wild type*. Il test fenotipico è, quindi, una misura diretta della concentrazione di farmaco necessaria per inibire la replicazione virale, espressa come rapporto tra la concentrazione necessaria per inibire una quantità fissa del virus da testare rispetto all'equivalente quantità di virus *wild type*. La suscettibilità in *vitro* è espressa come IC50 oppure IC90, ossia la concentrazione richiesta per inibire rispettivamente la replicazione virale del 50 e 90%. In tabella 1 sono riportate le principali differenze dei test fenotipici attualmente in commercio.

Tabella 1: Metodologie fenotipiche

	Antivirogram® (Virco)	PhenoSense™ (Monogram Biosciences)	Phenoscript™ (VIRalliance)
Regione	2.2 kb di pol	1.5 kb di pol	gag e 1 kb di pol
Metodologia	ricombinazione omologa	clonaggio con enzimi di restrizione	ricombinazione omologa
Cicli replicativi	multipli	singolo	singolo
Ceppo *wild type*	HXB-2	NL4-3	NL4-3
Sensibilità	> 1.000 cp/mL	≥ 500 cp/mL	≥ 200 cp/mL
Ipersuscettibilità	SI	SI	NO
Capacità replicativa	NO	SI	NO
Tempo di esecuzione	3-4 settimane	2 settimane	8-15 giorni

Test Genotipici

Attualmente in commercio esistono due saggi genotipici che studiano la regione proteasi e parte della regione retrotrascrittasi di HIV-1: TRUGENE® HIV-1 (Siemens Healthcare Diagnostics; Deerfield IL) e ViroSeqTM (Abbott/Celera Diagnostics; Chicago IL).
Il test genotipico dal punto di vista della procedura è articolato in:

- 1. amplificazione mediante RT-PCR della regione specifica del genoma di HIV
- 2. sequenziamento mediante marcatura con specifici fluorocromi
- 3. comparazione della sequenza nucleotidica ottenuta con un ceppo virale di riferimento per identificare le mutazioni che conferiscono resistenza ai farmaci antiretrovirali.

La sequenza nucleotidica ottenuta può essere anche utilizzata per definire il *clade* di appartenenza del virus ed eventuali forme virali ricombinanti (3).
Il genotipo è analizzato mediante algoritmi (tabella 2), i quali, sulla base delle mutazioni rilevate, classificano il virus in esame secondo livelli previsti di suscettibilità ai singoli farmaci (4). Le conoscenze della relazione fra genotipo e attività dei farmaci in *vivo*, tradotte nelle regole interpretative degli algoritmi, derivano in realtà dalla combinazione dei dati di correlazione fra genotipo e suscettibilità in *vitro*, storia terapeutica e risposta in *vivo* al farmaco.
Il ricorso a sistemi affidabili di *spotting* di plasma o sangue intero su appositi filtri assorbenti ha permesso, inoltre, di realizzare il test di resistenza anche su materiale proveniente da paesi a limitate risorse economiche e infrastrutturali.

Tabella 2: Metodologie genotipiche

Sistema	Tipo di interpretazione	Accesso
Stanford http://hivdb.stanford.edu	5 livelli di resistenza usando *rule hyperlinked* alle informazioni contenute nel database	libero via *web*
French National AIDS Research Agency http://www.hivfrenchresistance.org	3 livelli di resistenza determinate da un *set* di *rule* alle informazioni contenute nel database	libero via *web*
Rega Institute http://www.rega.kuleuven.be/cev/regadb/	3 livelli di resistenza sulla base di lavori pubblicati e valutazioni *in-house*	libero via *web*
GeneSeq™ HIV algorithm; Monogram	3 livelli di resistenza sulla base di lavori pubblicati e valutazioni *in-house*	a pagamento
Database ARCA http://www.hivarca.net	5 livelli di resistenza definiti dall'algoritmo AntiRetroScan versione 2.0	libero via *web* o mediante *account*
TRUGENE® HIV-1; Siemens	3 livelli di resistenza sulla base di lavori pubblicati e non, interpretati da un pannello di esperti (*update* a cadenza annuale)	associato al *kit*
ViroSeq™; Abbott	3 livelli di resistenza sulla base di dati pubblicati e non, interpretati da un pannello di esperti (*update* a cadenza annuale)	associato al *kit*
VirtualPhenotype™-LM; Virco	4 livelli di suscettibilità con definizione di *cut-off* biologici e clinici sulla base di correlati genotipo-fenotipo	a pagamento

Test di resistenza ai nuovi farmaci

L'approvazione dell'uso di enfuvirtide, raltegravir e maraviroc ha indotto a sviluppare nuovi saggi di resistenza che vedono coinvolti i geni envelope ed integrasi. Ad oggi esistono saggi genotipici non certificati per gp41 e integrasi (Siemens e Abbott) e due saggi fenotipici trofileTM (Monogran Biosciences) e PhenoscriptTM (VIRalliance) per il tropismo virale di cui solo il primo è disponibile commercialmente.
Per gli evidenti limiti dei test fenotipici (costi e tempi di esecuzione) sono stati recentemente approntati saggi genotipici mirati alla predizione del tropismo virale attraverso l'interpretazione della sequenza nucleotidica della regione ipervariabile V3 mediante gli algoritmi Geno2Pheno (http://www.geno2pheno.org) e PSSM (http://fortinbras.us/cgi-bin/fssm/fssm.pl).

Le nuove frontiere: PCR allele specifica e *pyrosequencing*

Uno dei limiti delle tecniche genotipiche di studio della farmacoresistenza è l'individuazione delle specie virali resistenti predominanti. Recenti studi hanno evidenziato l'importanza di rilevare varianti virali, che rappresentano meno del 20% della popolazione totale (5-7). Le potenziali applicazioni dei test genotipici ultrasensibili riguardano i pazienti *naive* nei quali ceppi resistenti trasmessi possono essere non più rilevabili e i pazienti in fallimento, nei quali varianti minoritarie divergenti dalla popolazione prevalente possono essere presenti e condizionare le terapie successive (8, 9).
I sistemi proposti per l'individuazione delle specie minoritarie (< 1%) resistenti includono: il rilevamento di specifici mutanti mediante sistemi allele-specifici basati su *real-time* PCR (6) e il sequenziamento parallelo tramite *pyrosequencing* (10). La prima tecnica prevede la costruzione dei cloni con le mutazioni in studio mediante mutagenesi sito-specifica e il disegno di *primer* e sonde marcate per la loro individuazione. La seconda si basa sulla rilevazione di un segnale luminoso proporzionale alla quantità di ciascun dNTP aggiunto alla reazione di sequenza. Ognuno di questi approcci presenta vantaggi e svantaggi (tabella 3).

Tabella 3: Nuove metodologie molecolari

Sistema	Svantaggi	Vantaggi
Real time PCR allele specifica	Accurata e specifica messa a punto per ogni mutazione	Elevata sensibilià (0.01%)
Sequenziamento tramite *pyrosequencing*	Costi elevati	Metodica standardizzata associata al *kit*
1. 454/Roche http://www.454.com 2. Solexa/Illumina http://www.illumina.com 3. ABI/SOLiD http://www.appliedbiosystems.com	Necessità di personale tecnico e informatico altamente qualificato	Analisi dell'intera regione

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI ESSENZIALI

1. Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, et al, Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel Clin Infect Dis. 2008; 47(2):266.
2. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. December 1, 2009; 1-161. Available at http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf
3. Balotta C, Facchi G, Violin M, et al, Increasing prevalence of non-clade B HIV-1 strains in heterosexual men and women, as monitored by analysis of reverse transcriptase and protease sequences. J Acquir Immune Defic Syndr. 2001; 27(5):499.
4. Van Laethem K, Vandamme AM. Interpreting resistance data for HIV-1 therapy management--know the limitations. AIDS Rev. 2006; 8(1):37.
5. Johnson JA, Li J-F, Wei X, et al. Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. PLoS Med 2008 5(7): e158. doi:10.1371/journal.pmed.0050158.
6. Metzner KJ, Giulieri SG, Knoepfel SA, et al, Minority quasispecies of drug-resistant HIV-1 that lead to early therapy failure in treatment-naive and -adherent patients. Clin Infect Dis. 2009; 48(2):239.
7. Simen BB, Simons JF, Hullsiek KH, et al. Low-abundance drug-resistant viral variants in chronically HIV-infected, antiretroviral treatment-naive patients significantly impact treatment outcomes. J Infect Dis. 2009; 199(5):693.
8. Peuchant O, Thiébaut R, Capdepont S, et al. Transmission of HIV-1 minority-resistant variants and response to first-line antiretroviral therapy.AIDS. 2008; 22(12):1417.
9. Loubser S, Balfe P, Sherman G, et al. Decay of K103N mutants in cellular DNA and plasma RNA after single-dose nevirapine to reduce mother-to-child HIV transmission. AIDS. 2006; 20(7):995.
10. Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, et al. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. Genome Res. 2007; 17(8):1195.

a cura di: **Valeria Micheli**[1], **Michela Violin**[2]
[1] Unità Operativa di Microbiologia, "L. Sacco", Milano
[2] Dipartimento di Scienze Cliniche, Sezione di Malattie Infettive e Immunopatologia, Ospedale "L. Sacco", Università di Milano

Update dal laboratorio

Approfondimento sul ruolo delle mutazioni nella resistenza ai farmaci anti-HBV, sui metodi di rilevazione della resistenza genotipica, sui test fenotipici e sul significato *in vivo* delle mutazioni, a cura della dottoressa **Laura Milazzo**, dell'Ospedale Sacco di Milano.

Test di resistenza ai farmaci anti-HBV

Nella pratica clinica la diagnosi di resistenza agli analoghi nucleosidici/nucleotidici anti-HBV si avvale della ricerca di mutazioni di resistenza genotipica, ovvero di mutazioni della sequenza aminoacidica della polimerasi virale. I test per l'identificazione delle mutazioni di resistenza genotipica disponibili in commercio sono elencati in tabella 1.

La sequenza diretta ha il vantaggio di identificare ogni mutazione, anche quelle non ancora note per indurre resistenza, ma solo se espresse in almeno il 20% delle quasispecie virali. Le tecniche di ibridizzazione (LIPA) consentono di evidenziare precocemente la presenza di mutazioni quando ancora sono state selezionate in almeno il 5% della popolazione virale. Utilizzano sonde di sequenza oligonucleotidiche note adese a membrana. Il maggior limite è rappresentato dalla necessità di un nuovo *set* di sonde specifiche per ogni mutante ricercato; inoltre non possono essere individuate mutazioni non già descritte.

Tabella 1 Metodi più comuni di rilevazione della resistenza genotipica

Metodica	Caratteristiche
Sequenza diretta (PCR) (TRUGENE HBV, Siemens Diagnostic Solutions Affigene HBV DE/3TC Assay, Sangtec Molecular Diagnostics)	■ Meno sensibile ■ Identifica solo mutazioni presenti in oltre il 20% della popolazione virale ■ Riconosce tutte le mutazioni, anche quelle "nuove" e non descritte
Reverse Hybridization (INNO-LIPA DR Version 2.0, Innogenetics)	■ Più sensibile ■ Identifica varianti presenti nel 5% della popolazione virale ■ Riconosce solo mutazioni già descritte

Tabella 2 Metodi meno comuni di rilevazione della resistenza genotipica

Metodica	Caratteristiche
Tecniche di sequenziamento ■ Microchip-based technology ■ Single Genome Sequencing	■ Costose ■ Non facilmente disponibili ■ Non usate nella pratica clinica
■ RFLP (restriction fragment length polymorphism) ■ MALDI-TOF MS (matrix assisted desorption/ionization time-on-flight mass spectrometry)	■ Estremamente sensibili ■ Identificano varianti presenti fino all'1% della popolazione virale ■ Riconoscono solo mutazioni già descritte ■ Difficile applicabilità o necessità di accesso a spettrometro di massa

Altre tecniche, meno diffuse e più laboriose, per la determinazione delle resistenze genotipiche sono elencate in tabella 2.

L'analisi RFLP identifica polimorfismi nei siti di restrizione, talvolta però le mutazioni distruggono il sito di restrizione e possono creare difficoltà di interpretazione. Infine è possibile utilizzare una analisi spettrometrica dei piccoli frammenti di DNA contenenti le mutazioni.

Resistenza fenotipica in *vitro* ai farmaci anti-HBV

Sebbene non utilizzati nella diagnostica clinica routinaria, i test fenotipici servono a dimostrare che una determinata sostituzione aminoacidica conferisce resistenza, attraverso il confronto della replicazione di un clone di virus mutato e di un clone *wild-type*. I test in *vitro* si basano sulle concentrazioni di farmaco richieste a inibire il 50% (IC50) del virus *target* rispetto al referente *wild-type*, pertanto forniscono una informazione "quantitativa" della resistenza di un dato ceppo virale. Clinicamente la resistenza antivirale viene definita alta (concentrazioni di farmaco in grado di inibire il 50% del virus maggiori di > 100 volte), media (maggiori di 10-99 volte) o bassa (maggiori di 2-9 volte).
Vengono eseguiti mediante l'utilizzo di sonde enzimatiche e vettori o mediante transfezione di linee cellulari epatocitarie. Esiste infine il cosiddetto fenotipo virtuale, che assegna un fenotipo a un determinato isolato clinico, basandosi sulle correlazioni esistenti in un vasto database contenente informazioni cliniche, genotipiche e fenotipiche (http://www.seqvirology.com/genome7/index.htm).
In tabella 3 sono riportate le principali mutazioni di resistenza, il loro significato in *vitro* e l'interpretazione in *vivo*.

Tabella 3 Significato in *vitro* e in *vivo* delle mutazioni di resistenza antivirale

	lamivudina		telbivudina		entecavir		adefovir		tenofovir	
HBV	Res.		Res.		Res.		Res.		Res.	
Wild-type	1	S	1	S	1	S	1	S	1	S
M204I	>100	R	4	R	1	I	<1-8	S	<1	S
L180M + M204V	>100	R	ND	R	5-6	I	<1-4	S	3-6	S
A181T/V	1-2	I	5-6	S	1-4	S	1-3	R	1	S
N236T	1	S	3	S	<1	S	3	R	5	I
I169T + V173L + M250V	>1000	R	>1000	R	>700	R	1	S	<1	S
T184G + S202I	>1000	R	35	R	>700	R	2	S	6	S
A194T	ND		ND		ND		ND		2	S

S = sensibile; I = suscettibilità intermedia; R = resistente; ND = non disponibile

Modificata da Lok AS, et al. Hepatology 2007

Nonostante l'ottima barriera genetica evidenziata per tenofovir, la comparsa della mutazione A194T specie se in associazione a resistenza a lamivudina e su ceppi mutanti-precore (HBeAg-negativi) ha dimostrato in *vitro* di indurre resistenza fenotipica. Ad oggi sono stati riportati 2 casi di pazienti coinfetti HIV/HBV in terapia con l'associazione tenofovir + lamivudina e virus HBV persistentemente replicante a seguito della comparsa delle mutazioni L180M + A194T + M204V. Il fenomeno appare raro, ma è indispensabile un attento monitoraggio dei pazienti in terapia a lungo termine anche con farmaci ad elevata barriera genetica.

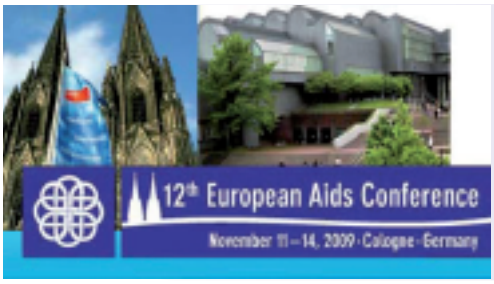
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI ESSENZIALI

1. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. Hepatology 2007; 46:254-265.
2. Sheldon J, Camino N, Rodés B, et al. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. Antivir Ther 2005; 10:727-734.
3. Amini-Bavil-Olyaee S, Herbers U, Sheldon J, et al. The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains. Hepatology 2009; 49:1158-65.

a cura di: **Laura Milazzo**,
Azienda Ospedaliera Universitaria Luigi Sacco, Milano

Colonia, 11-14 novembre 2009

12th European AIDS Conference, EACS



Tra i molti e interessanti interventi *made in Italy* alla prestigiosa European AIDS Conference ne abbiamo scelti alcuni che rappresentano le linee di tendenza più importanti della ricerca clinica in campo AIDS.

Il Registro Italiano della Profilassi Post-Esposizione

Il dottor Vincenzo Puro, dell'IRCCS Spallanzani di Roma, ha presentato i risultati 2002-2007 del Registro Italiano della Profilassi Post-Esposizione (PEP), che si riferiscono a 39 centri per un totale di 535 casi. Il 41.5% dei soggetti era rappresentato da donne, l'età media era 31 anni (*range* 13-68), la maggior parte aveva ricevuto 2 NRTI + 1 PI. Nel 42% dei casi, si trattava di coppie sierodiscordanti, nel 43.9% di *partner* casuali, nel 9.7% di violenza sessuale. La fonte di contagio era rappresentata da un soggetto HIV-positivo (59.8%), mentre lo stato sierologico non era noto nel 37.6% dei casi. La PEP è stata completata dal 73% dei soggetti, con un tasso del 48% di eventi avversi. Il 50% di chi interrompeva la PEP aveva manifestato un evento avverso. La perdita al *follow up* era associata al sesso maschile, alla violenza sessuale, all'interruzione della PEP e all'assenza di eventi avversi.

Il momento del *counselling* sui comportamenti sessuali sicuri sembra il migliore per fornire informazioni sulla PEP (compresi l'analisi del rischio, l'efficacia e la tossicità dei farmaci), e vanno rinforzati i messaggi sulla prevenzione primaria della trasmissione di HIV e mediante un più ampio utilizzo del condom. La riduzione delle esposizioni al contagio è uno dei fattori critici per aumentare l'efficacia della profilassi post-esposizione.

Dai dati del Registro Italiano PEP emerge il completamento della profilassi nel 73% dei 535 soggetti coinvolti

La mortalità per neoplasie nei pazienti HIV-infetti

Lo studio, presentato dal dottor Vincenzo Spagnuolo del Dipartimento di Malattie Infettive dell'IRCSS San Raffaele di Milano, mostra un eccesso di mortalità per tumore (4 volte superiore) nei pazienti HIV-positivi rispetto alla popolazione generale. I tassi di mortalità erano superiori nei soggetti più giovani (< 40 anni di età) mentre nei pazienti di età più avanzata (> 60 anni) tendevano ad essere inferiori. L'analisi ha riguardato 6495 pazienti del database dell'IRCCS San Raffaele, dei quali 537 avevano un tumore (370 ADM, 167 NADM) e presentavano le seguenti caratteristiche: età 44 anni, infezione di HIV da10 anni, 9% coinfezione HBV, 23.5% confezione HCV, 31% con AIDS. Il 52% dei casi era deceduto per tumore, il 7.9% perso al *follow up*.

Dimostrato un eccesso (di 4 volte superiore) di mortalità per tumore nei pazienti HIV-positivi

Le relazioni tra HAART e integrità ossea nei pazienti pediatrici, e tra stima del rischio cardiovascolare e aterosclerosi subclinica nei *naive*

Impatto della ARV sul contenuto minerale osseo in bambini e adolescenti HIV-infetti

La terapia antiretrovirale esercita effetti negativi sull'integrità ossea dei pazienti HIV-positivi in età giovanile, come dimostrato dal gruppo della professoressa Alessandra Viganò, dell'Università di Milano, O. Sacco, che ha analizzato in uno studio osservazionale 86 pazienti HIV-positivi (età tra 5 e 22 anni) e 194 soggetti sani di età simile. Quindici pazienti erano *naive* all'ARV, 11 erano in terapia con 2 NRTI, 32 ricevevano una terapia PI-*based* e 28 NNRTI-*based*. I pazienti che ricevevano un PI, ma non gi altri farmaci, mostravano valori di BMC inferiori ai soggetti sani. In particolare, ritonavir a dosaggio pieno e stavudina risultavano i farmaci maggiormente correlati alla perdita ossea.

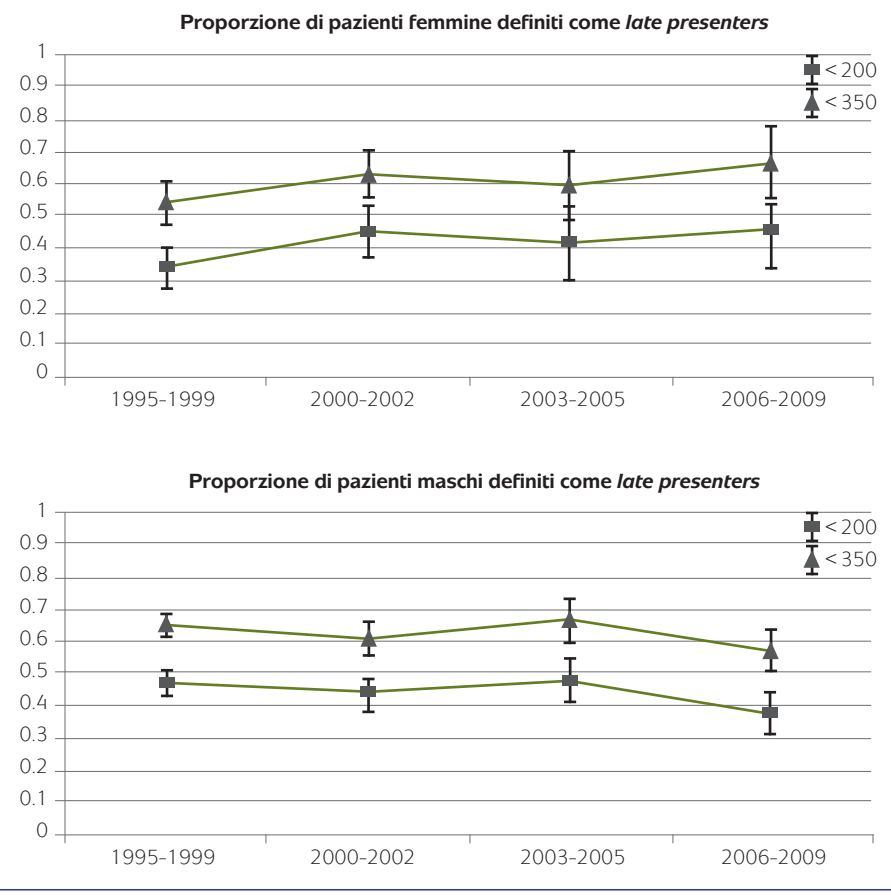
Correlazione tra stima del rischio cardiovascolare e aterosclerosi subclinica nei pazienti *naive*: lo studio HERMES

Lo studio HERMES, presentato da GV De Socio, dell'Ospedale di Perugia, ha l'obiettivo di identificare i fattori di rischio di sindrome metabolica e di malattia cardiovascolare in pazienti *naive*. Nel sottogruppo di pazienti esaminati con ultrasonografia carotidea (72 dei 140 arruolati nella fase *nested*), è stata valutata la probabilità di sviluppare eventi cardiovascolari entro 10 anni utilizzando diverse scale di rischio. In questi soggetti, di età media di 40 anni e l'80% dei quali maschi, le lesioni carotidee sub-cliniche mostrano un associazione altamente significativa con tutti i fattori predittivi di rischio cardiovascolare. Il Global Framingham Risk Score (GFRS) e l'età vascolare (stimata utilizzando un nuovo modello derivato dal GFRS e confrontato con età cronologica) erano altamente predittivi. Dallo studio viene, quindi, l'indicazione a sottoporre ad ultrasonografia carotidea i pazienti con infezione da HIV con un GFRS superiore al 6%: nella popolazione analizzata, il 55% dei pazienti con un rischio compreso tra il 6 ed il 20% presentava lesioni.

Bassa conta di CD4 e stato di AIDS *presenter* nei pazienti *naive*: i dati di Fondazione ICONA

I dati presentati dalla professoressa Antonella d'Arminio Monforte, dell'Ospedale San Paolo, Università degli Studi di Milano, si riferiscono a 1902 soggetti *naive* e mostrano che il 61% dei pazienti di nuova diagnosi ha una conta di CD4 inferiore a 350 cellule/mm^3 ed è quindi considerato *late presenter*. Il 43% presenta una malattia in stadio avanzato (< 200 cellule/mm^3) e il 16% AIDS. I principali fattori predittivi di presentazione tardiva erano l'essere stranieri, l'età

Figura 1 ***Late presenters*** **nella coorte ICONA**



D'Arminio Monforte A, EACS 2009, Abstract LS2/2

I dati della Fondazione ICONA mostrano una bassa conta di CD4 e lo stato di AIDS *presenters* nel 61% dei pazienti di nuova diagnosi

avanzata, l'alta carica virale; i soggetti eterosessuali erano a maggior rischio che non gli omosessuali maschi. I soggetti *late presenters* presentavano un rischio di decesso 3-4 volte superiore rispetto ai non *late presenters* "Questi dati - ha commentato la professoressa - hanno tenuto conto anche alla nuova classificazione diagnostica dell'infezione (< 350 cell/mm^3) e quindi la quota di pazienti in uno stadio più avanzato di infezione risulta superiore. In realtà, l'analisi dei *trend* temporali mostra che, dall'attivazione, nel registro ICONA la quota dei pazienti *late presenters*, è rimasta stabile nel tempo".

La proteina C reattiva e l'uso di abacavir rappresentano dei predittori indipendenti di rischio cardiovascolare

Biomarker di infiammazione e predizione degli eventi cardiovascolari nei pazienti HIV-positivi in terapia

Dall'analisi dei soggetti arruolati nei Registri ICONA e dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma, presentata dal dottor Andrea De Luca, emerge che la proteina C reattiva e l'uso attuale o pregresso di abacavir sono fattori fortemente predittivi di eventi cardiovascolari nei pazienti HIV-positivi indipendentemente dai fattori di rischio cardiovascolari tradizionali. Per ogni caso di IMA, cardiopatia o rivascolarizzazione, sono stati scelti due controlli simili per abitudine a fumare e diabete: i dati di t-PA, PAI-1, d-dimero, proteina C reattiva, IL-6 e p-selettina sono stati misurati prima della data dell'evento (nei casi) o all'ultima visita eseguita (nei controlli).

L'età media era di 46 anni, il colesterolo di 198 mg/dl, la PAS 127 mmHg, i CD4 erano in media 670 cell/mm^3, la carica virale 2.61 log10 copie/ml, erano già stati utilizzati in media 5 farmaci ARV in precedenza, il 7% era in terapia con e il 14% aveva ricevuto in passato abacavir.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

d'Arminio Monforte A, Cozzi-Lepri A, Fanti I, et al. Icona Foundation Study Group, Proportion and trend over calendar time of patients with a low CD4 cell count or AIDS diagnosis at the time of their first contact with clinical care in Italy HIV Medicine 10;2:1-246 (October 2009), *Abstracts of the 12th European AIDS Conference/EACS, 11-14 November 2009, Cologne, Germany, LS2/2*.

De Luca A, M Colatigli M, de Gaetano Donati K, et al. Inflammatory biomarkers predict cardiovascular events in HIV-positive patients receiving cART: a case-control study HIV Medicine 10;2:1-246 (October 2009), *Abstracts of the 12th European AIDS Conference/EACS, 11-14 November 2009, Cologne, Germany, PS11/5*.

De Socio GV, Martinelli C, Ricci E, et al. Relations between cardiovascular risk estimates and subclinical atherosclerosis in naive HIV patients: results from the HERMES study HIV Medicine 10;2:1-246 (October 2009), *Abstracts of the 12th European AIDS Conference/EACS, 11-14 November 2009, Cologne, Germany, PS11/4*.

Puro V, De Carli G, Schifano E, et al, on behalf of Italian Registry of Antiretroviral Post-Exposure Prophylaxis, Antiretroviral prophylaxis following sexual exposure to HIV in Italy, HIV Medicine 10;2:1-246 (October 2009), *Abstracts of the 12th European AIDS Conference/EACS, 11-14 November 2009, Cologne, Germany, BPD1/5*.

Spagnuolo V, Galli L, Sampietro S, et al. Mortality due to cancer in HIV-infected patients compared to the Italian general population HIV Medicine 10;2:1-246 (October 2009), *Abstracts of the 12th European AIDS Conference/EACS, 11-14 November 2009, Cologne, Germany, PS6/3*.

Viganò A, Zuccotti G, Gabiano C, et al. Antiretroviral therapy and bone mineral measurements in HIV-infected children and youths. HIV Medicine 10; 2:1-246 (October 2009), *Abstracts of the 12th European AIDS Conference/EACS, 11-14 November 2009, Cologne, Germany, PS9/4*.

Boston, 30 ottobre - 3 novembre 2009

ReAdfiles

American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD

Dal report del nostro inviato, gli *"highlights"* delle novità più importanti emerse dalla 60° edizione del Congresso statunitense, suddivisi per argomenti

Raffaele Bruno Divisione Malattie Infettive e Tropicali, IRCCS Ospedale San Matteo, Pavia

Nelle sessioni sull'epatite cronica C, approfonditi i fattori di rischio degli effetti collaterali della terapia e le modalità di risposta terapeutica in alcune categorie di pazienti

EPATITE CRONICA C

Effetti collaterali alla terapia

I fattori di rischio per anemizzazione sono: età, sesso femminile, ipertensione arteriosa, bassi livelli di emoglobina e bassi livelli basali di HCVRNA (Basso M et al, abstr. 854).

L'anemizzazione è correlata a una migliore risposta terapeutica (Sievert W et al, abstr. 1557).

La piastrinopenia si associa a sanguinamenti di lieve entità (Roomer R et al, abstr. 827).

Categorie particolari di pazienti

- Pazienti con genotipo 1 e alta carica virale (sovrappeso o con steatosi): migliorano la risposta quando si inizia la terapia con una dose più elevata di Interferone peghilato e/o di ribavirina (Reddy K et al, abstr. 61).
  I soggetti con meno di 45 anni rispondono meglio alla terapia (Nanna H et al, abstr. 877).
- Donne in menopausa. La menopausa accelera il processo di fibrosi e le donne in menopausa rispondono meno alla terapia. Potrebbe quindi essere indicata la terapia sostitutiva con estrogeni in queste pazienti (Karampatou A et al, abstr. 403).
- Bassi livelli di vitamina D riducono la risposta alla terapia, mentre la supplementazione di vitamina D ne migliora l'esito (Petta S et al, abstr. 1330, SM Abu-Mouch, abstr. LB20).
  La correzione della dislipidemia con statine migliora significativamente la risposta alla terapia dell'epatite (Harrison S et al, abstr. 120).
- Impiego della ribavirina. Un pre-trattamento di 4 settimane con sola ribavirina migliora la risposta nei non *responder*.
  Dosare la ribavirina nel sangue dopo 2 settimane permette di aggiustare il dosaggio e migliorare la risposta (Brillanti A et al, abstr. 32).

NUOVI FARMACI

- Telaprevir

Il ritrattamento con peginteferone alfa 2a + ribavirina + telaprevir permette di ottenere una SVR nel 72,5% dei precedenti *relapser* e nel 38% dei non *responder* (McHutchison JG et al, abstr. 483). Telaprevir aumenta la risposta anche nei pazienti "difficili da trattare" (alta viremia, razza nera, età superiore ai

Focus sui nuovi farmaci per l'epatite C, sui fattori di rischio e su come gestire lo sviluppo di resistenze nell'epatite B

45 anni, sesso maschile, sovrappeso, genotipo 1a, fibrosi avanzata) (Everson GT et al, abstr. 1).

■ Boceprevir

Pazienti inizialmente non responsivi alla terapia *standard* hanno mostrato una risposta quando è stato aggiunto boceprevir. L'aggiunta di boceprevir alla terapia *standard* dopo 4 settimane ottiene una percentuale di SVR fino al 62% a 24 settimane (Kwo PY et al, abstr. 62, Kwo PY et al, abstr. 1582).

■ Narlaprevir

L'associazione iniziale tra IFN Pegilato alfa 2b, ribavina e narlaprevir (SCH 900518) per 2 settimane migliora la percentuale di SVR sia in pazienti *naive* che pretrattati (Vierling JM et al, abstr. LB4).

■ Inibitori della proteasi di seconda generazione: BI 201335, ABT-333, MK 7009, R7227/ITMN-191. Altri farmaci: alfa1 timosina, nitazoxanide, silibinina.

Questi farmaci, a differente meccanismo di azione, sono potenzialmente in grado di aumentare la risposta, soprattutto in soggetti pretrattati (Pol S et al, abstr. LB16, Manns MP et al, abstr. 23, Rodriguez - Torres M et al, abstr. LB6, Le Pogam S et al, abstr. 1585, Ciancio A et al, 1564 - Scherzer T et al, abstr. 847).

■ Taribavirina

Taribavirina sembra possedere la stessa efficacia della ribavirina ma mostra una minore incidenza di anemizzazione (Poordad F et al, abstr. 305).

■ Vaccino terapeutico

Due vaccini terapeutici, denominati GI-5005 e IC41 sembrano in grado di aumentare la percentuale di risposta alla terapia (Klade CS et al, abstr. 1558).

EPATITE B

La steatosi epatica rappresenta un fattore di rischio di progressione verso la fibrosi severa, la cirrosi e l'epatocarcinoma in soggetti con epatite cronica B (Petta S et al, abstr. 1334, Heller T et al, abstr. 911).

I soggetti con coinfezioni HBV-HCV hanno una buona possibilità di risposta all'interferone nei confronti di entrambe i virus e anche i soggetti con epatite delta hanno una discreta possibilità di rispondere all'interferone.

La gestione dei soggetti con resistenza alla lamivudina, può essere basata sulla somministrazione di interferone peghilato alfa 2 a, che possiede un'efficacia superiore a adefovir da solo, sulla associazione con adefovir, oltre che sull'impiego di entecavir e tenofovir. Quest'ultimo si è rivelato il farmaco più efficace nei cirrotici scompensati. I pazienti resistenti a altri antivirali possono essere ritrattati con una combinazione di due farmaci contenente tenofovir con buona possibilità di risposta. Telbivudina e clevudina hanno confermato la loro efficacia, la prima soprattutto nei pazienti HBsAg positivi (Liaw Y et al, abstr. 422, Sarin N et al, abstr. 454, Marcellin P et al, abstr. 481 - Heathcote E et al, abstr. 483).

In primo piano la gestione del paziente con cirrosi, le nuove possibilità terapeutiche nel carcinoma epatocellulare e le indicazioni all'utilizzo del Fibroscan

CIRROSI

Il consumo di caffè con caffeina sembra essere in grado di rallentare la comparsa di fibrosi epatica (Modi A A et al, abstr. 1097).
L'obesità peggiora l'evoluzione della cirrosi epatica, per cui i pazienti cirrotici devono per prima cosa perdere peso (Berzigotti A et al, abstr. 284).
L'infusione di eritromicina prima dell'endoscopia in soggetti con ematemesi migliora la visibilità endoscopica, abbrevia i tempi endoscopici, le complicazioni, il tempo di degenza e la necessità di una seconda endoscopia (33).
La somministrazione di midodrina in paziente affetti da ascite refrattaria aumenta la diuresi (34).
L'aggiunta di probiotici alla norfloxacina non aumenta l'efficacia nella profilassi della peritonite batterica spontanea (35).

CARCINOMA EPATOCELLULARE

Il trattamento con interferone dopo resezione chirurgica prolunga il tempo libero da ripresa del tumore e la sopravvivenza (Altraif IH et al, abstr. 207).
L'evoluzione a lungo termine di un trattamento chirurgico rispetto alla radiofrequenza in soggetti con HCC singolo e di piccole dimensioni e con cirrosi iniziale appare più favorevole (Yun W et al, abstr. 1677).
La radioembolizzazione con Ittrio-90 è un trattamento efficace nelle forme avanzate di epatocarcinoma, anche con trombosi portale (Kulik LM et al, abstr. 1670, Hilgard P et al, abstr. 1680).
Pazienti con epatocarcinoma hanno risposto in maniera favorevole al trattamento con sorafenib e chemioembolizzazione transarteriosa (Reyes DK et al, abstr. LB9).

FIBROSCAN

Fibroscan permette di monitorare l'evoluzione della fibrosi nei pazienti con epatite cronica C: l'elastanza aumenta con l'evoluzione della malattia, è minore nei pazienti che hanno risposto al trattamento, riduce la necessità di biopsie epatiche e valuta la fibrosi anche nei soggetti con steatosi. Inoltre, associato a Fibrotest, può aiutare a distinguere le epatiti croniche B inattive da quelle attive (Guirgis M et al, abstr. 498, Martinez SM et al, abstr. 841, de Ledinghen V et al, abstr. 985, Castera L et al, abstr. 1464, Andersen ES et al, abstr. 213).

Figura Fibroscan

GLI ABSTRACT SONO RACCOLTI IN:
Hepatology Volume 50 Issue S4, Pages 1 - 1246 (2009) Supplement: The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2009.
http://www3.interscience.wiley.com/journal/122607193/issue

Stoccolma, 2-3 novembre 2009

HIV in Europe

Working Together for Optimal Testing and Earlier Care

Al centro del *meeting* l'identificazione degli ostacoli ad un più ampio accesso ed esecuzione del test diagnostico per HIV in Europa

HIV in Europe è un'iniziativa promossa da medici, pazienti, rappresentanti della società civile e organismi governativi europei, impegnati nella promozione della diagnosi precoce e dell'accesso al test HIV e alle terapie antiretrovirali. Coordinata dal Copenaghen HIV Programme, vi partecipano alcuni dei principali organismi europei impegnati in questo campo: tra gli obiettivi più importanti, ridurre la quota dei pazienti che si presentano tardi alla diagnosi *(late presenter)*, mediante il miglioramento delle politiche sanitarie, un accesso ottimale a diagnosi e terapie e il rispetto dei diritti della persona.

Tra i programmi più importanti in corso, la lotta contro la stigmatizzazione e la criminalizzazione dell'infezione, la messa a punto di linee guida sulle metodologie di rilevazione dei casi non ancora diagnosticati e l'identificazione della malattie che possono indicare la presenza di HIV.

"Quest'ultimo progetto, ci dice la professoressa Antonella d'Arminio Monforte, che è uno dei coordinatori, ha l'obiettivo di identificare una lista di malattie indice dell'infezione da HIV, ed è stato uno dei principali argomenti del recente *meeting* di HIV in Europe di Stoccolma.

Il numero di persone con infezione da HIV o AIDS in Europa è aumentato da 1.5 milioni nel 2001 a 2.2 milioni nel 2007: si calcola che una persona su tre non conosca il proprio stato sierologico e che la percentuale di *late presenters* si aggiri intorno al 50%.

La maggior parte dei casi di infezione da HIV in Europa rimane, quindi, senza diagnosi, con un'ampia variabilità dal 15 all'80% tra i diversi paesi. Le stime delle nuove infezioni a trasmissione sessuale tra i portatori di HIV indicano che i pazienti non identificati (pari al 25% del totale) rendono conto del 54% delle nuovi infezioni. L'analisi di costo-efficacia suggerisce un importante risparmio se viene testata una popolazione con una prevalenza di HIV superiore allo 0.1%.

Nella prima fase del progetto, viene verificata formalmente, sulla base dell'*evidence-based medicine*, la maggior incidenza nei pazienti HIV-positivi di una serie di condizioni cliniche indice di HIV, che dovrebbero, quindi, rappresentare un campanello d'allarme sull'esecuzione del test.

Con questo obiettivo, viene testata la presenza di HIV-positività nei soggetti che presentano queste 8 patologie:

- **malattie a trasmissione sessuale (comprese gonorrea, sifilide e clamydia)**
- **linfoma maligno,**
- **displasia o cancro anale o cervicale,**
- **herpes zoster (in soggetti < 65 anni),**

- infezione acuta o cronica da virus HBV o HCV,
- malattia simil-mononucleosi attiva,
- leucocitopenia o trombocitopenia,
- dermatite seborroica o esantema.

Se la presenza di HV è superiore all'1/1000 nei soggetti che presentano queste patologie, questa incidenza è superiore rispetto a quella nella popolazione generale e, quindi, queste patologie diventano indice di HIV.

Nei 17 centri clinici europei è iniziato l'arruolamento dei 7500 pazienti previsti, e la conclusione della prima fase è prevista per metà 2010. Ad oggi sono stati arruolati i primi 400 pazienti. I centri italiani partecipanti sono 3: il Centro MTS dell'IRCCS Policlinico di Milano, la Divisione di Ematologia e la Divisione di Epatologia dell'Ospedale San Paolo di Milano.

Da questa prima fase del progetto, sulla base della prevalenza di HIV nei pazienti con queste malattie nei diversi paesi europei, potranno essere messe a punto linee guida specifiche per un accesso precoce e più allargato al test, con l'obiettivo di mantenere alti *standard* per la diagnosi, nel rispetto dei diritti della persona.

Il progetto identificherà anche le barriere all'esecuzione del test dal punto di vista dei clinici, implementando una maggiore collaborazione multidisciplinare nella gestione terapeutica del paziente con infezione da HIV.

E,' infatti, importante poter coinvolgere il maggior numero di referenti di diverse discipline mediche nella definizione di un elenco di patologie indice di HIV/AIDS, tenendo conto delle differenze tra i vari paesi nella gestione assistenziale dei soggetti con queste patologie: la presenza di ognuna di queste condizioni dovrebbe indicare la necessità del test, in modo da ottimizzare il ricorso a questo strumento diagnostico secondo le raccomandazioni delle linee guida".

Viene promossa l'implementazione del test nei soggetti che presentano almeno una delle 8 patologie considerate indice della presenza di infezione

9° Congresso Nazionale SIMIT

Equità, formazione e ricerca

SIMIT Società Italiana di Malattie Infettive e Tropicali

ERGIFE PALACE HOTEL

Roma 24 25 26 27
novembre 2010

Coordinamento **Scientifico**

Istituto Nazionale di Malattie Infettive, IRCCS Lazzaro Spallanzani, Roma

PRESIDENTI
A. Antinori (Roma), G. Ippolito (Roma)

COORDINATORI SCIENTIFICI
E. Girardi (Roma), F. Lauria (Roma)

SEGRETERIA SCIENTIFICA
A. Ammassari (Roma), E. Nicastri (Roma)

Comitato **Scientifico**

PRESIDENTE
E. Sagnelli (Napoli)

VICEPRESIDENTE
O. Armignacco (Viterbo)

PAST-PRESIDENT
F. Mazzotta (Antella, FI)

SEGRETARIO
R. Russo (Catania)

CONSIGLIERI
M. Andreoni (Roma), G. Angarano (Bari), F. Castelli (Brescia), R. Cauda (Roma), A. Chirianni (Napoli), A. d'Arminio Monforte (Milano), F. De Rosa (Roma), E. Francavilla (Belluno), A. Lazzarin (Milano), F. Maggiolo (Bergamo), M. Mazzeo (Salerno), E. Petrelli (Pesaro), G. Raineri (Cuneo), L. Sighinolfi (Ferrara), G. Todaro (Messina)

PROBIVIRI
A. Orani (Lecco), F. Piccinino (Napoli), E. Pizzigallo (Chieti), M. Toti (Grosseto)

Comitato **Organizzativo**

A. Aceti (Roma), F. Aiuti (Roma), G. Antonelli (Roma), M. Antonini (Roma), G. Antonucci (Roma), M. Barbeschi (Ginevra, CH), C. Bibbolino (Roma), P. Borgia (Roma), M.R. Capobianchi (Roma), F. Cicogna (Roma), V. Colizzi (Roma), A. Di Carlo (Roma), A. Di Caro (Roma), F. Dianzani (Roma), B. Ensoli (Roma), M. Evangelista (Roma), G. Fadda (Roma), C. Favalli (Roma), I. Gallo (Frosinone), L. Martini (Roma), F. Martini (Roma), C. Mastroianni (Latina), F. Matarazzo (Gaeta, LT), A. Morrone (Roma), P. Narciso (Roma), G. Natalini Raponi (Rieti), F. Palmieri (Roma), C.F. Perno (Roma), C. A. Perucci (Roma), N. Petrosillo (Roma), P. Pezzotti (Roma), M. G. Pompa (Roma), L. Paolo Pucillo (Roma), V. Puro (Roma), V. Racalbuto (Roma), G. Rezza (Roma), P. Rossi (Roma), F. Soscia (Latina), A. Spanò (Roma), G. Taliani (Roma), V. Tozzi (Roma), S. Vella (Roma), L. Vellucci (Roma), M. Venditti (Roma), V. Vullo (Roma)

Main Topic Congresso

SESSIONI PLENARIE

- Dengue: eziopatogenesi, controversie cliniche
- Emergenze infettive e sanità globale
- Infezioni associate a procedure assistenziali
- Infezione da HIV: aspetti clinici e terapeutici
- Infezioni nell'ospite immunocompromesso
- Influenza pandemica
- La risposta immunospecifica alle infezioni
- Modelli e target per l'eradicabilità delle infezioni virali
- Sostenibilità dei farmaci antinfettivi ad alto costo
- Trapianti e infezioni

SESSIONI PARALLELE

- Farmaci biologici e complicanze infettive
- Gli interventi italiani in Africa
- Infezione e malattia da micobatterio tubercolare
- Infezioni da virus epatitici B e C in popolazioni speciali
- Infezioni da virus epatitici non-B e non-C
- L'accesso universale alla diagnosi e cura delle malattie infettive nei paesi poveri
- Neuropatologie infettive
- Neutropenia e rischio di infezioni
- Patogeni di difficile inquadramento e trattamento
- Patologie tropicali in paesi industrializzati
- Polmoniti nosocomiali
- Ruolo dell'industria nella ricerca di trasferimento in malattie infettive
- Strategie vaccinali per la prevenzione e il controllo delle infezioni
- Studi di coorte di patologie infettive

Corsi di Aggiornamento

Mercoledì 24 novembre

- CORSI PER INFETTIVOLOGI E BIOLOGI
  - **Indicatori di *outcome* e di processo in Malattie Infettive**
  - **Come leggere un articolo scientifico**
- CORSO PER INFETTIVOLOGI E RADIOLOGI
  Le nuove tecniche di diagnosi per immagine nello studio delle malattie da infezione
- CORSO PER PERSONALE INFERMIERISTICO E OPERATORI DELLA PREVENZIONE
  Procedure infermieristiche "sicure" e basate sulle evidenze
- CORSO PER MICROBIOLOGI, VIROLOGI, INFETTIVOLOGI, BIOLOGI
  Le nuove tecniche molecolari nello studio dei microrganismi e dei loro rapporti con l'ospite: prospettive di applicazione nelle malattie da infezione

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA
Effetti srl - Via Gallarate 106, 20151 Milano - Tel. +39 02 3343281 - Fax +39 02 38006761
e-mail: simit2010@effetti.it - http:www.simit2010.it

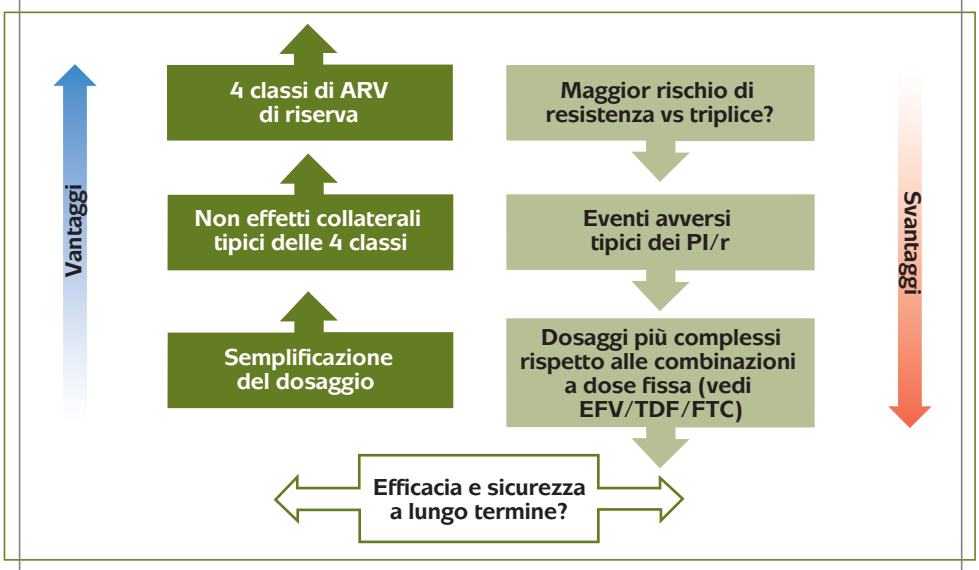
La "monoterapia" con PI: nuovi contributi dagli studi con darunavir/r

Massimo Galli, Istituto di Malattie Infettive e Tropicali, Università degli Studi di Milano, AO.L. Sacco

Gli studi MONET e MONOI hanno valutato l'impiego del nuovo e potente PI darunavir nelle strategie di semplificazione terapeutica

L'idea di sfruttare gli inibitori della proteasi in strategie di semplificazione terapeutica ha preso consistenza ormai da qualche anno.
La potenza di questi farmaci e la garanzia, offerta dal *boost* di ritonavir, di un mantenimento protratto dei livelli terapeutici, hanno stimolato ricerche volte a saggiarne l'efficacia senza il contemporaneo utilizzo degli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa.
Oltre che da obiettivi di convenienza, semplificazione e riduzione della spesa, questo approccio è sostenuto dalla necessità di indagare modalità terapeutiche alternative, nella previsione di situazioni cliniche in cui gli NRTI non possano, o non possano ulteriormente, essere somministrati.
La monoterapia con PI è, di fatto, la prima "violazione del dogma" - che impone che la terapia antiretrovirale si basi su "combinazioni triplici" - che si sia dimostrata in grado di produrre risultati interessanti.
Forse per questo, pur avendo guadagnato molti estimatori, dispone di un numero non inferiore di detrattori. In particolare, sembra essere diffuso il timore che il trasferimento della "monoterapia" con PI alla pratica clinica corrente possa essere gravato di un numero di fallimenti terapeutici superiore a quanto i risultati degli studi permetterebbero di attendere (figura 1).

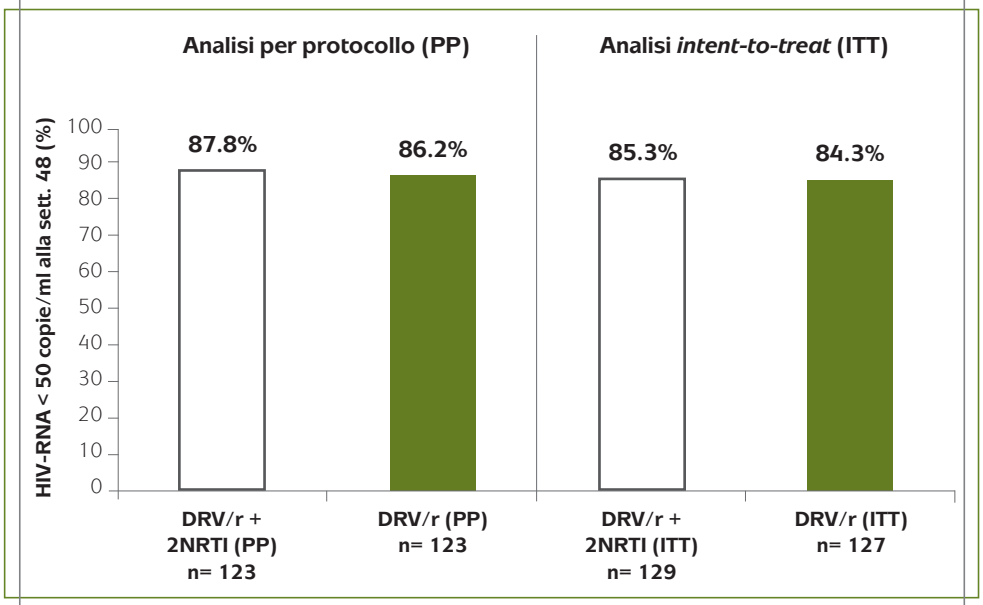
Figura 1 Potenziali vantaggi e svantaggi della monoterapia con PI/r



Da: Mascolini M, Ten thoughts on how HIV care may change in 10 years, Research Initiative, Vol 14, N2, fall 2009

Lo studio MONET ha dimostrato la non-inferiorità della monoterapia DRV/r 800/100 in somministrazione unica giornaliera rispetto al trattamento standard

Figura 2 Studio MONET: analisi primaria di efficacia, HIV-RNA inferiore a 50 copie/ml alla settimana 48



Da: Arribas J, Horban A, Gerstoft J, et al. AIDS 2010, 24: 223-30

In una recente rassegna, *Bierman et al* elencano le esperienze degli ultimi 5 - 6 anni, riportando risultati di studi di monoterapia che hanno coinvolto indinavir, saquinavir, atazanavir e soprattutto lopinavir/ritonavir.
Gli stessi autori propongono una metanalisi che include i sei studi randomizzati attuati con lopinavir/ritonavir, in cui si dimostra che il tasso di fallimento virologico è significativamente maggiore nei bracci che prevedono "monoterapia" rispetto a quelli in "triplice". Tuttavia, considerando come "non falliti" i pazienti in cui il ripristino della "triplice" ha conseguito una nuova e stabile soppressione della replicazione virale, i due bracci hanno dato risultati non significativamente differenti.

Come atteso, la disponibilità di un nuovo potente PI, darunavir, ha suggerito di estenderne l'impiego anche a strategie di semplificazione. Sono al momento già valutabili i dati a 48 settimane di due studi, MONET e MONOI, presentati allo IAS 2009 di Capetown.

Lo studio MONET

Lo studio MONET, pubblicato su *AIDS*, ha arruolato 256 pazienti, in trattamento antiretrovirale, con viremia stabilmente inferiore alle 50 copie/ml per oltre 24 settimane. I pazienti sono stati assegnati a caso, in proporzione 1:1, a un trattamento con darunavir/ritonavir 800/100 in somministrazione unica giornaliera, accompagnato da due

Tabella 1 Studio MONET: risposte virologiche alla settimana 48, per i soggetti inclusi nell'analisi per protocollo (PP) e nell'analisi *intent-to-treat* (ITT)

Risposta	Monoterapia (%)	Triplice terapia (%)	Delta (IC 95%)
HIV RNA < 50 (PP)	86.2	87.8	-1.6% (-10.1, + 6.8%)
HIV RNA < 50 (ITT)	84.3	85.3	-1.0% (-9.9, + 8.8%)
HIV RNA < 50 (S = I)	93.5	95.1	-1.6% (-7.4, + 4.2%)
HIV RNA < 50 (OF)	91.3	94.6	-3.2% (-9.5, + 3.1%)
HIV RNA < 200 (OF)	97.6	98.4	-0.8% (-4.2, + 2.6%)

OF = fallimenti osservati, include solo gli *endpoint* virologici; S = I analisi che include gli *switch*, includendo solo i dati a 48 settimane

Da: Arribas J, Horban A, Gerstoft J, et al. AIDS 2010, 24: 223-30

La possibilità di somministrazione una volta al giorno rende il trattamento facile e conveniente e limita il dosaggio giornaliero di ritonavir

NRTI, o a darunavir/ritonavir, allo stesso dosaggio, in "monoterapia". A 48 settimane i pazienti con viremia al di sotto delle 50 copie/ml erano, in un'analisi "per protocollo", l'86.2% nel braccio "in monoterapia" e l'87.8% nel braccio in "triplice", mentre nell'analisi basata sul criterio di intenzione al trattamento (ITT), risultavano rispettivamente dell'84.3% e dell'85.3%, rispettivamente (figura 2).

Indipendentemente dalle variazioni di terapia, le viremie inferiori a 50 copie/ml risultavano rispettivamente il 93.5% e il 95.1% (tabella 1).

Gli Autori potevano pertanto concludere che tutti gli approcci analitici messi in atto deponevano per la non-inferiorità della monoterapia rispetto al trattamento *standard*.

Confrontando i dati dello studio MONET con quelli dello studio OK, che, con criteri simili, gli stessi Autori hanno attuato con lopinavir, le viremie al di sotto delle 50 copie/ml alla 48ª settimana risultavano, in ITT, l'84.3% nel primo e l'81% nel secondo studio.

Lo studio MONOI

Lo studio MONOI è stato effettuato somministrando *bis in die* darunavir/ritonavir 600/100. Duecentoventisei pazienti, in cui era stata ottenuta una stabile riduzione della viremia al di sotto delle 50 copie/ml per otto settimane, sono stati assegnati ad una randomizzazione 1:1 per la prosecuzione di DRV/r 600/100 *bid* in associazione a 2 NRTI o il passaggio alla monoterapia con darunavir. Alla 48ª settimana, l'analisi ITT ha evidenziato il 92% di viremie al di sotto di 50 copie/ml nei pazienti in triplice rispetto all'86.6% nei pazienti passati in monoterapia. Questa differenza è risultata lievemente al di sotto dei criteri fissati in questo studio per la non-inferiorità.

Riducendosi verosimilmente anche l'impatto metabolico del trattamento, i dati a due anni potranno consentire una valutazione più completa sulla possibilità di trasferire la monoterapia con questo farmaco alla pratica quotidiana

L'analisi "per protocollo" non ha evidenziato, però, differenze significative tra i due bracci, anche se la percentuale di fallimenti rimaneva inferiore nel braccio in triplice.

Alcune osservazioni

Considerati complessivamente, gli studi con PI in monoterapia evidenziano una percentuale di successi che non sempre risulta non inferiore a quella dei trattamenti in triplice.
Non sono stati inoltre evidenziati chiari vantaggi per quanto riguarda alcuni effetti collaterali, come per esempio quelli gastrointestinali.
Il rischio di selezione di mutazioni conferenti resistenza a PI si è rivelato, tuttavia, in tutti gli studi molto ridotto e il ripristino di una risposta virologica completa con la reintroduzione dei nucleosidici è stato ottenuto nella maggioranza dei casi.
I dati a favore di un possibile impiego in monoterapia di darunavir/ritonavir aprono nuove prospettive a questa strategia di trattamento. In particolare, la possibilità di somministrazione una volta al giorno rende l'assunzione facile e conveniente e limita il dosaggio giornaliero di ritonavir rispetto a quanto necessario con altri farmaci della stessa classe, riducendo verosimilmente anche l'impatto metabolico del trattamento.
I dati a due anni, attesi entro il 2010, potranno consentire una valutazione più completa sulla possibilità di trasferire la monoterapia con questo farmaco alla pratica quotidiana.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI
1. **Arribas J, Horban A, Gerstoft J, et al.** The MONET trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA below 50 copies/ml. *AIDS 2010, 24: 223-30.*
2. **Bierman WF, van Agtmael MA, Nijhuis M, et al.** HIV monotherapy with ritonavir-boosted protease inhibitors: a systematic review. *AIDS. 2009; 23:279-291.*
3. **Katlama C, Valentin MA, Algarte-Genin M, et al.** Efficacy of darunavir/ritonavir as single-drug maintenance therapy in patients with HIV-1 viral suppression: a randomized open-label non-inferiority trial, MONOI-ANRS 136 C. 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. *July 19-22, 2009. Cape Town. Abstract WELBB102.*

Gestione dei pazienti HBV+ pre-trattati con lamivudina

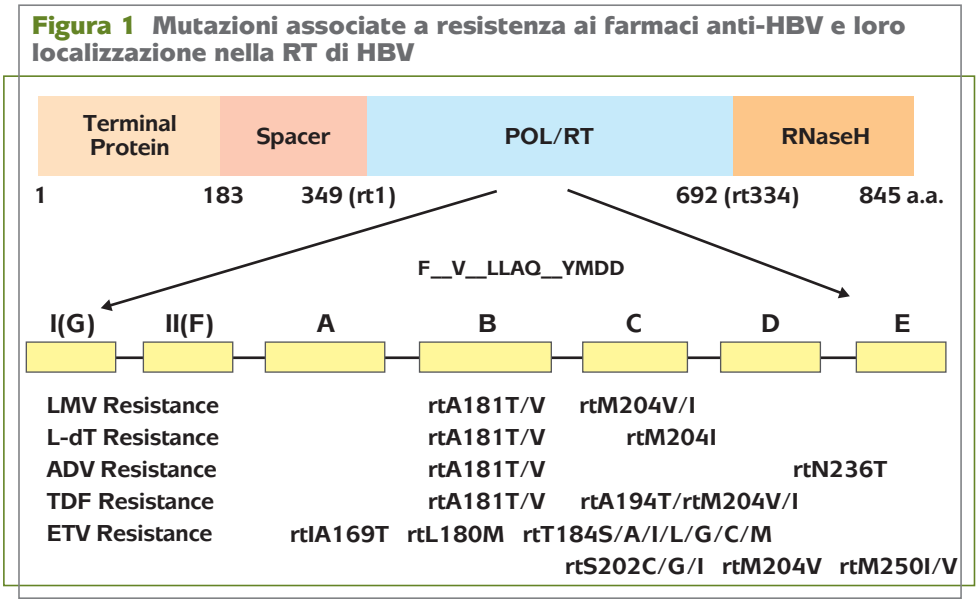
Valentina Svicher, **Carlo Federico Perno**, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

I farmaci antivirali (lamivudina, adefovir, entecavir, telbivudina, tenofovir) bloccano l'attività della trascrittasi inversa, enzima cruciale per la replicazione di HBV, e ad oggi l'unico bersaglio farmacologico per la cura dell'epatite B cronica. In particolare, agiscono da terminatori di catena bloccando l'allungamento della catena nascente di DNA e conseguentemente la produzione di nuove particelle virali. Entecavir, oltre ad agire da terminatore di catena, è inoltre in grado di ridurre la capacità della trascrittasi di incorporare nucleotidi trifosfato. Questo duplice meccanismo di azione può spiegare l'elevata potenza di cui è dotato questo farmaco.

Sfortunatamente, l'efficacia dei farmaci antivirali può essere compromessa dallo sviluppo della farmaco-resistenza. Un ceppo virale farmaco-resistente è in grado di replicare anche in presenza del farmaco stesso grazie a specifiche mutazioni che compaiono nella proteine bersaglio dei farmaci, e quindi nel caso di HBV nella trascrittasi inversa (figura 1). Grazie a queste mutazioni, la trascrittasi inversa non è più inibita dal farmaco e può procedere indisturbata nella sintesi del genoma virale. Ciò consente la produzione di nuove particelle virali, evento che conduce ad un aumento della viremia e conseguentemente alla progressione della malattia. Diversi studi hanno, infatti, mostrato come la farmaco-resistenza possa condurre ad un peggioramento delle condizioni istologiche del fegato, ad un'accelerata progressione dell'epatite verso la cirrosi e l'epatocarcinoma, e ad un aumento del rischio di morte in pazienti che

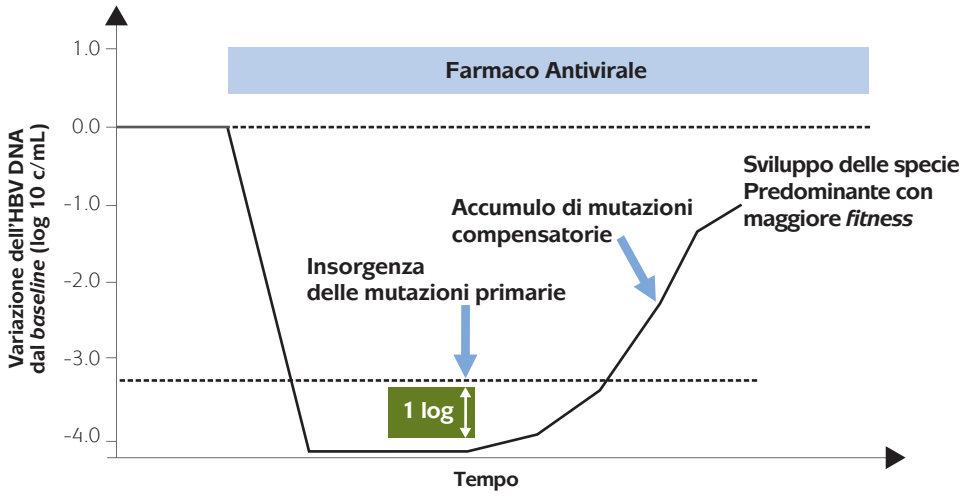
Nel caso di HBV, un ceppo virale farmaco-resistente è in grado di replicare anche in presenza del farmaco stesso, grazie a specifiche mutazioni che compaiono nella trascrittasi inversa

Figura 1 Mutazioni associate a resistenza ai farmaci anti-HBV e loro localizzazione nella RT di HBV



La resistenza ai farmaci antivirali insorge tutte le volte che il trattamento non riesce a ridurre ai minimi la replicazione virale

Figura 2 Andamento della viremia in caso di sviluppo di ceppi farmacoresistenti



Sotto una pressione farmacologica incongrua insorgono inizialmente le mutazioni "primarie", in grado di impedire il legame della trascrittasi inversa con il farmaco. Poichè le mutazioni primarie riducono la capacità replicativa del virus, la loro comparsa è seguita da un progressivo accumulo di mutazioni definite "compensatorie", che aumentano la fitness del virus e al tempo stesso il grado di resistenza al farmaco.

Modificato da Locarnini et al. Antivir Ther 2004; 9:679-93

hanno subito un trapianto di fegato (1, 2). Impostare un regime antivirale congruo ed altamente efficace è pertanto fondamentale per migliorare la qualità di vita del paziente e soprattutto la sua stessa sopravvivenza.

Il tasso di sviluppo della farmacoresistenza varia per i farmaci anti-HBV ed insorge quando la terapia antivirale non riesce a ridurre ai minimi termini la replicazione virale, ciò si può facilmente verificare in una delle seguenti condizioni:

- terapia poco potente (come nel caso di alcune monoterapie)
- scarsa aderenza
- problemi di farmacocinetica dovuti ad uno scarso assorbimento dei farmaci.

Il sospetto di farmacoresistenza deve sorgere quando:

- si verifica un aumento dei livelli di HBV-DNA di almeno 1 logaritmo dal valore di *nadir* osservato durante il trattamento (figura 2)
- dopo 6 mesi dall'inizio del trattamento, la viremia ha subito una riduzione inferiore a due logaritmi.

In questi casi, è opportuno eseguire il test di resistenza genotipica per verificare la presenza di ceppi virali farmacoresistenti.

Il test di resistenza genotipica, prima di iniziare un nuovo trattamento, è fondamentale per impostare un corretto regime terapeutico.

La resistenza alla lamivudina

Tra i tutti farmaci anti-HBV, lamivudina è quello che possiede la minore barriera genetica alla resistenza. Dopo solo quattro anni di trattamento ben l'80% dei pazienti è, infatti, resistente a tale farmaco (3).

In particolare, la resistenza a lamivudina è mediata da 3 mutazioni chiave:

- la M204V e M204I, che ricadono nella regione nota come YMMD, cruciale per l'attività della trascrittasi inversa (4)
- le mutazioni A181T/V.

Queste mutazioni primarie impediscono il legame del farmaco con l'enzima ed al tempo stesso riducono la capacità replicativa della trascrittasi inversa. In presenza delle mutazioni M204I/V, la *fitness* virale viene successivamente ripristinata grazie all'accumulo delle mutazioni compensatorie, quali la V173L, L180M, L80I/V. In particolare, un recente studio ha mostrato come la presenza della L80I/V sia in grado di aumentare la *fitness* del virus compromessa dalla M204I e contemporaneamente di aumentare il livello di resistenza alla lamivudina (4).

Un recente studio ha mostrato come i profili di resistenza alla lamivudina siano complessi già nelle fasi precoci del fallimento virologico (5). In particolare, le mutazioni primarie (M204I, M204V, e A181T) sono state riscontrate in 17/22 (88.8%) pazienti trattati con lamivudina in monoterapia, attentamente monitorati, e in cui si è osservato per la prima volta un rialzo della viremia (> 12IU/ml e < 345IU/ml) al di sopra dei livello di rilevazione del test. Con una singola eccezione, le mutazioni primarie sono state sempre osservate insieme a mutazioni compensatorie, evidenziando la complessità dei profili mutazionali riscontrati.

La complessità della resistenza a lamivudina è ancor più evidente in virtù del fatto che alcuni ceppi di HBV resistenti ai farmaci antivirali sono al tempo stesso resistenti anche agli anticorpi, anche quelli indotti dal vaccino (6).

Poiché lamivudina è stata per molti anni l'unico farmaco per la cura dell'epatite B cronica, gran parte dei pazienti con epatite B cronica ha ricevuto e ha sviluppato resistenza a questo farmaco, e pertanto necessita di un nuovo trattamento. Diverse sono le strategie terapeutiche che possono essere utilizzate in caso di fallimento virologico:

- la strategia dell'***add-on*** che prevede l'aggiunta di un nuovo farmaco al regime in fallimento
- la strategia dello ***switch*** che prevede la sostituzione del farmaco ormai inefficace con un nuovo farmaco attivo
- la strategia della ***de novo combination*** che prevede l'uso di una terapia combinata con due farmaci attivi.

Questa ultima strategia è raccomandata soprattutto per i pazienti in stadio avanzato della malattia.

Qualunque sia la strategia terapeutica da attuare, le linee guida raccomandano di costruire il nuovo regime terapeutico *ad hoc* sul paziente sulla base dei profili di resistenza riscontrati (7). Data l'elevata complessità dei profili di resistenza alla lamivudina, il nuovo regime terapeutico deve essere costruito in modo razionale con molta attenzione.

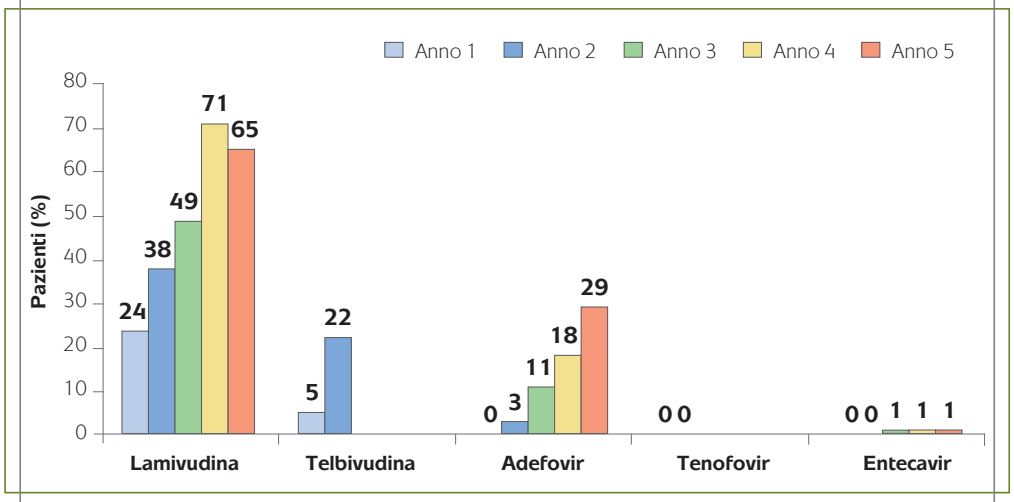
Entecavir nei pazienti pre-trattati con lamivudina

Entecavir, approvato nel 2005, è un farmaco dotato di una elevata potenza, ed elevata barriera genetica alla resistenza. Entecavir è infatti l'unico farmaco anti-HBV che richiede l'accumulo di ben tre mutazioni per subire una riduzione di efficacia (figura 3). L'alta barriera genetica di HBV fa sì che nei pazienti *drug-naive* insorga raramente e a distanza di molto tempo dall'inizio del trattamento. Dopo 5 anni di trattamento in prima linea con entecavir, solo l'1% dei pazienti ha sviluppato resistenza (8). Ciò fa sì che entecavir sia raccomandato dalle linee guida dell'EASL nei pazienti con epatite B cronica che devono iniziare un regime terapeutico di prima linea.

Poiché lamivudina è stata per molti anni l'unico farmaco per la cura dell'epatite B cronica, gran parte dei pazienti con epatite B cronica ha ricevuto e ha sviluppato resistenza a questo farmaco, e pertanto necessita di un nuovo trattamento

Entecavir è un farmaco dotato di potenza e di barriera genetica alla resistenza elevate, richiedendo l'accumulo di ben tre mutazioni per subire una riduzione di efficacia

Figura 3 **Incidenza cumulativa della resistenza per i diversi farmaci anti-HBV**



tratto da Ghany et al., Hepatology 2009

Nei pazienti pre-trattati con lamivudina, l'uso di entecavir dipende dal *pattern* mutazionale riscontrato al fallimento della lamivudina stessa. In particolare, entecavir può rappresentare una valida opzione terapeutica nei pazienti in fallimento con lamivudina e in cui sono comparse le mutazioni A181T/V (9). Queste mutazioni, infatti, non inficiano minimamente né l'efficacia di entecavir né la sua barriera genetica alla resistenza.

La barriera genetica di entecavir subisce, invece, una riduzione nei pazienti che hanno fallito un trattamento con lamivudina con le mutazioni M204V + L180M. Quest'ultime sono infatti in grado di facilitare la comparsa di ulteriori mutazioni (in posizione 169, 184, 202 e 250) che aumentano considerevolmente il livello di resistenza ad entecavir (10-12). Un recente studio ha mostrato come la co-presenza delle mutazioni in posizione 184, 202, e 250 con la M204V + L180M induca una modificazione conformazionale della trascrittasi inversa di HBV tale da ridurre la tasca di legame di entecavir all'enzima (13), impedendo al farmaco di svolgere la sua azione inibitoria.

La barriera genetica non sembra essere inficiata dall'altra mutazione associata a resistenza a lamivudina: la M204I (10).

E' pertanto presumibile che entecavir (in monoterapia o in combinazione con altri farmaci) possa rappresentare una opzione terapeutica nei pazienti pre-trattati con lamivudina in cui si è sviluppata la mutazione M204I. Sono necessari ulteriori studi per chiarire questo punto.

Entecavir potrebbe rappresentare una eccellente scelta terapeutica anche nel contesto

del *pro-active switch*. Questa strategia terapeutica prevede la sostituzione di un farmaco poco potente e a bassa barriera genetica (quale lamivudina) con un farmaco più potente e con una maggiore barriera genetica.
La sua innovatività risiede nel fatto che questa sostituzione è attuata durante il successo virologico prima che si manifesti il fallimento virologico.
Ciò al fine di garantire il mantenimento del successo virologico a lungo termine ed evitare la comparsa di complessi profili di resistenza che potrebbero restringere il panorama di opzioni terapeutiche disponibili. Un recente studio ha mostrato come nei pazienti trattati con lamivudina e in successo virologico (HBV DNA < 12IU/ml), la presenza di mutazioni associata a resistenza è rara ed in ogni caso non coinvolge mutazioni associate a resistenza a entecavir (13).

Raccomandato dalle linee guida EASL come farmaco di prima linea, entecavir è indicato nei pazienti pre-trattati con lamivudina in base al *pattern* mutazionale osservato al fallimento con lamivudina stessa

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. **Dienstag JL, Cianciara J, Karayalcin S, et al.** Durability of serologic response after lamivudine treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology. 2003 Apr; 37(4):748-55.*
2. **Liaw YF, Chien RN, Yeh CT.** No benefit to continue lamivudine therapy after emergence of YMDD mutations. Antivir Ther. *2004 Apr; 9(2):257-62.*
3. **Ghany M, Liang TJ.** Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. Gastroenterology. *2007 Apr; 132(4):1574-85.*
4. **Warner N, Locarnini S, Kuiper M, et al.** The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro. Antimicrob Agents Chemother. *2007 Jul; 51(7):2285-92. Epub 2007 Apr 16.*
5. **Svicher V, Alteri C, Gori C, et al.** Lamivudine Resistance Mutations in HBV Reverse Transcriptase Can Be Selected even at Extremely Low Level of Viral Replication. *Presented at XVII Internal HIV Drgu Resistance Workshop, Fort Meyrs June 2009.*
6. **Torresi J, Earnest-Silveira L, Civitico G, et al.** Restoration of replication phenotype of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by compensatory changes in the "fingers" subdomain of the viral polymerase selected as a consequence of mutations in the overlapping S gene. *Virology. 2002 Jul 20;299(1):88-99.*
7. **EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B.** European Association for the Study of the Liver. *Journal of Hepatology 50 (2009) 227-242.*
8. **Colonno RJ, Rose R, Baldick CJ, et al.** Entecavir resistance is rare in nucleoside naïve patients with hepatitis B. Hepatology. *2006 Dec; 44(6):1656-65.*
9. **Villet S, Pichoud C, Billioud G, et al.** 2008. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure. *J. Hepatol. 48:747-755.*
10. **Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, et al.** Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present. *Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 902-911.*
11. **Langley DR, Walsh AW, Baldick CJ, et al.** Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J Virol. 2007; 81:3992-4001.*
12. **Baldick CJ, Tenney DJ, Mazzucco CE, et al.** Comprehensive evaluation of hepatitis B virus reverse transcriptase substitutions associated with entecavir resistance. *Hepatology. 2008; 47:1473-1482.*
13. **Mukaide M, Tanaka Y, Shin-I T, et al.** The mechanism of entecavir resistance of hepatitis B virus with viral breakthrough as determined by long-term clinical assessment and molecular docking simulation. *Antimicrob Agents Chemother. 2009 Nov 23.*

ICAR

ITALIAN CONFERENCE ON AIDS AND RETROVIRUSES

Presidente Giampiero CAROSI

Co-Presidenti Francesco CASTELLI
Giorgio PALÙ
Fredy SUTER

programma scientifico

Basic Sciences

1. Virology
2. Immunopathogenesis

Clinical sciences

3. Efficacy of HAART
4. Long term toxicity of HAART
5. Co-infections and co-morbidities

Epidemiology and Social sciences

6. Epidemiology and prevention
7. Pharmacoeconomics, access to care and quality of life

segreteria organizzativa

ICM International s.r.l.
Viale del Vignola, 44
00196 Roma

tel (+39) 06.321.107.73
fax (+39) 06.325.001.19
segreteria@icminternational.eu

ICAR

ITALIAN CONFERENCE ON AIDS AND RETROVIRUSES

promosso da

S.I.M.I.T.	*Società Italiana di Malattie Infettive e Tropicali*
I.N.M.I.	*Istituto Nazionale Malattie Infettive*
I.S.S.	*Istituto Superiore di Sanità*
S.I.I.C.A.	*Società Italiana di Immunologia, Immunologia Clinica e Allergologia*
S.I.Ma.S.T.	*Società Interdisciplinare per lo Studio delle Malattie Sessualmente trasmissibili*
S.I.V.	*Società Italiana di Virologia*
S.I.V.I.M.	*Società Italiana di Virologia Medica*
ANLAIDS	*Associazione Nazionale per la lotta contro l'Aids*
ARCIGAY	*Associazione Lesbica e Gay Italiana*
LILA	*Lega Italiana per la Lotta contro l'Aids*
NADIR	*Fondazione Nadir Onlus*

Brescia — Facoltà di Medicina e Chirurgia, Viale Europa, 11

20-22 GIUGNO 2010

www.icar2010.it

SCADENZA INVIO ABSTRACTS

15 marzo 2010, ore 18.00 Sottomissione online.

15 maggio 2010 Notifica accettazione degli abstracts.

DEADLINE EARLY REGISTRATION

15 marzo 2010

ICAR® 2010
ITALIAN CONFERENCE on AIDS and RETROVIRUSES

Faculty

ReAd files

Resistenza e Adesione alle terapie nella cura dell'AIDS

direttore scientifico

M. Moroni, Milano

comitato di redazione

A. Antinori, Roma
C. Balotta, Milano
T. Bini, Milano
S. Bonora, Torino
M. Borderi, Bologna
R. Bruno, Pavia
A. Castagna, Milano
A. Gori, Monza
S. Lo Caputo, Firenze
F. Maggiolo, Bergamo
G.C. Marchetti, Milano
L. Meroni, Milano
L. Milazzo, Milano
L. Monno, Bari
C. Mussini, Modena
L. Palmisano, Roma
M. Puoti, Brescia
S. Rusconi, Milano
V. Svicher, Roma
M. Viganò, Milano

comitato scientifico

M. Andreoni, Roma
G. Angarano, Foggia
A. Antinori, Roma
S. Antinori, Milano
G. Antonelli, Roma
C. Balotta, Milano
S. Bonora, Torino
C. Boucher, Utrecht (NL)
L. Calza, Bologna
G. Carosi, Brescia
A. Castagna, Milano
R. Cauda, Roma
M. Clementi, Milano
R.T. D'Aquila, Nashville (USA)
A. d'Arminio Monforte, Milano
A. De Luca, Roma
A. De Rossi, Padova
G. Di Perri, Torino
R. Esposito, Modena
G. Filice, Pavia
M. Galli, Milano
J. Gatell, Barcellona (ES)
C. Giaquinto, Padova
G. Ippolito, Roma
C. Katlama, Parigi (FR)
D.R. Kuritzkes, Boston (USA)
J. Lange, Amsterdam (NL)
B. Larder, Cambridge (UK)
A. Lazzarin, Milano
S. Lo Caputo, Firenze
F. Maggiolo, Bergamo
F. Mazzotta, Firenze
L. Meroni, Milano
L. Minoli, Pavia
L. Monno, Bari
J.S.G. Montaner, Vancouver (CA)
C. Mussini, Modena
L. Palmisano, Roma
C.F. Perno, Roma
M.B. Regazzi, Pavia
G. Rezza, Roma
D.D. Richman, San Diego (USA)
S. Rusconi, Milano
F. Starace, Roma
F. Suter, Bergamo
C. Torti, Brescia
S. Vella, Roma
C. Viscoli, Genova
V. Vullo, Roma
M. Zazzi, Siena

norme per gli autori

Gli articoli, di lunghezza massima di 5.500 battute, corredati da elementi iconografici e dai riferimenti bibliografici essenziali (massimo 10), dovranno essere inviati esclusivamente via e-mail, alla Redazione di **ReAd files** a Claudia Balotta o a Luca Meroni (readfiles@effetti.it).
Il Comitato di Redazione si riserva di valutarne la pubblicazione sulla testata.

editore

Editore: effetti © srl
Via Gallarate, 106 - 20151 Milano
www.effetti.it - www.readfiles.it
tel. 02 3343281 - Fax 02 38002105
Direttore Responsabile: F. Tacconi
Coordinamento editoriale: C. Balotta, L. Meroni
Coordinamento redazionale: A. Invernizzi, M. Luciani
Impaginazione: M. Compostini
Segreteria di Redazione: E. Valli
Stampa: Magicgraph srl - Via Galvani, 2 - 21052 Busto Arsizio (VA)

ReAd files

ReAd files

Resistenza e Adesione alle terapie nella cura dell'AIDS

Major Sponsor:

Abbott
A Promise for Life

Bristol-Myers Squibb Company

GILEAD

MERCK SHARP & DOHME

ViiV Healthcare

Altri Sponsor:

Boehringer Ingelheim