



Highlight dal  
**4°** Expert Panel Workshop HIV

Gli inibitori del CCR5 nel  
management terapeutico dell'HIV:  
tra ricerca e pratica clinica

# Il test genotipico: implicazioni virologiche e cliniche

LE MODIFICAZIONI DEL TROPISMO DI HIV-1  
NELLA STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE DA HIV

PAG **3**

I VANTAGGI DEL TEST GENOTIPICO E IL SUO USO  
NELLA PRATICA CLINICA: I RISULTATI DELLO STUDIO OSCAR

PAG **5**

LA VALUTAZIONE DEL TROPISMO VIRALE NEL PAZIENTE  
VIROSOPPRESSO O CON VIREMIA RESIDUA:  
IL TEST GENOTIPICO SU DNA PROVIRALE

PAG **8**

# FACULTY

- Massimo Andreoni** Divisione di Malattie Infettive, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Tor Vergata, Roma
- Gioacchino Angarano** Clinica di Malattie Infettive, Università degli Studi, Bari
- Andrea Antinori** Dipartimento Clinico, III Divisione di Malattie Infettive, IRCCS - INMI Lazzaro Spallanzani, Roma
- Orlando Armignacco** Unità Operativa Complessa di Malattie Infettive, Ospedale Belcolle, ASL di Viterbo
- Stefano Bonora** Clinica Universitaria di Malattie Infettive, Ospedale Amedeo di Savoia, Torino
- Marco Borderi** Unità Operativa Malattie Infettive del Dipartimento Attività Integrata Malattie Apparato Digerente e Medicina Interna Policlinico Sant'Orsola Malpighi, Bologna
- Raffaele Bruno** Divisione Malattie Infettive e Tropicali, IRCCS Ospedale S. Matteo, Università degli Studi, Pavia
- Giampiero Carosi** Istituto di Malattie Infettive e Tropicali, Azienda Ospedaliera Spedali Civili, Università degli Studi, Brescia
- Antonella Castagna** Divisione di Malattie Infettive, IRCCS Centro S. Raffaele del Monte Tabor, Università Vita-Salute, Milano
- Roberto Cauda** Istituto di Clinica delle Malattie Infettive, Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico Universitario A. Gemelli, Roma
- Piergiorgio Chiriaco** Unità Operativa Malattie Infettive, Ospedale Perrino, Brindisi
- Antonio Chirianni** Divisione di Malattie Infettive, Azienda Ospedaliera D. Cotugno, Napoli
- Massimo Clementi** Divisione di Microbiologia, IRCCS Centro S. Raffaele del Monte Tabor, Università Vita-Salute, Milano
- Antonella d'Arminio Monforte** Clinica di Malattie Infettive e Tropicali, Azienda Ospedaliera Polo Universitario-San Paolo, Milano
- Andrea De Luca** Istituto di Clinica delle Malattie Infettive, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- Carlo De Stefano** Unità Operativa Malattie Infettive, Azienda Ospedaliera Regionale San Carlo, Potenza
- Giulio De Stefano** Unità Operativa Malattie Infettive, Ospedale Madonna delle Grazie, Matera
- Giovanni Di Perri** Clinica Universitaria Malattie Infettive, Ospedale Amedeo di Savoia, Torino
- Cecilia Fico** Unità Operativa Malattie Infettive, Ospedale Francesca Fallacara, Triggiano (BA)
- Gaetano Filice** Divisione Malattie Infettive e Tropicali, IRCCS Ospedale S. Matteo, Università degli Studi, Pavia
- Daniela Francisci** Clinica di Malattie Infettive, Università degli Studi, Perugia
- Massimo Galli** Sezione di Malattie Infettive e Immunopatologia, Dipartimento di Scienze Cliniche "Luigi Sacco", Università degli Studi, Milano
- Andrea Gori** Unità Operativa Malattie Infettive, Azienda Ospedaliera San Gerardo, Monza (MI)
- Adriano Lazzarin** Divisione di Malattie Infettive, IRCCS Centro S. Raffaele del Monte Tabor, Università Vita-Salute, Milano
- Sergio Lo Caputo** Unità Operativa di Malattie Infettive, Ospedale Santa Maria Annunziata, Antella (FI)
- Ruggero Losappio** Unità Operativa di Malattie Infettive, Ospedale Civile V. Emanuele II, Bisceglie (BT)
- Paolo Maggi** Clinica delle Malattie Infettive, Policlinico di Bari
- Franco Maggiolo** USC di Malattie Infettive, Ospedali Riuniti, Bergamo
- Claudio M. Mastroianni** Unità Operativa Complessa Universitaria di Malattie Infettive, Azienda ASL di Latina-Polo Pontino, Latina
- Francesco Mazzotta** Unità Operativa Complessa di Malattie Infettive, Azienda Sanitaria, Firenze
- Laura Monno** Clinica di Malattie Infettive, Università degli Studi, Bari
- Mauro Moroni** Commissione Nazionale AIDS
- Cristina Mussini** Clinica delle Malattie Infettive, Policlinico Universitario, Modena
- Paola Nasta** Clinica di Malattie Infettive e Tropicali, Azienda Ospedaliera Spedali Civili di Brescia
- Silvia Nozza** Divisione di Malattie Infettive, IRCCS Centro S. Raffaele del Monte Tabor, Università Vita-Salute, Milano
- Saverio Parisi** Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Azienda Ospedaliera di Padova
- Carlo Federico Perno** Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Università Tor Vergata, Roma
- Maria Carla Re** Dipartimento di Ematologia e Scienze Oncologiche «L. E A. Seragnoli» - Microbiologia, Università degli Studi, Bologna
- Francesco Resta** Struttura Complessa di Malattie Infettive, Presidio Ospedaliero San Giuseppe Moscati, Taranto
- Giuliano Rizzardini** I Divisione di Malattie Infettive, Azienda Ospedaliera Universitaria Luigi Sacco, Milano
- Stefano Rusconi** Sezione di Malattie Infettive e Immunopatologia, Dipartimento di Scienze Cliniche "Luigi Sacco", Università degli Studi, Milano
- Evangelista Sagnelli** Dipartimento di Medicina Pubblica, Clinica e Preventiva, Sezione Malattie Infettive, Seconda Università degli Studi, Napoli
- Teresa Antonia Santantonio** Clinica Malattie Infettive, Università degli Studi, Foggia
- Annalisa Saracino** Clinica Malattie Infettive, Università degli Studi, Foggia
- Valentina Svicher** Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Università Tor Vergata, Roma
- Giuseppe Tambussi** Divisione di Malattie Infettive, IRCCS Centro S. Raffaele del Monte Tabor, Università Vita-Salute, Milano
- Carlo Torti** Istituto di Malattie Infettive e Tropicali, Azienda Ospedaliera Spedali Civili, Università degli Studi, Brescia
- Valerio Tozzi** Dipartimento Clinico, III Divisione di Malattie Infettive, IRCCS - INMI Lazzaro Spallanzani, Roma
- Paolo Tundo** Unità Operativa Malattie Infettive, Ospedale Santa Caterina Novella, Galatina (LE)
- Emanuela Vaccher** Dipartimento di Oncologia Medica, IRCCS Centro di Riferimento Oncologico, Aviano (PN)
- Stefano Vella** Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma
- Vincenzo Vullo** Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Università degli Studi La Sapienza, Roma
- Maurizio Zazzi** Dipartimento di Biologia Molecolare, Università degli Studi, Siena

# Il test genotipico: implicazioni virologiche e cliniche

Il tropismo virale come strumento diagnostico per la terapia ARV personalizzata, i vantaggi del test genotipico e il suo utilizzo nella pratica clinica corrente, i recenti dati emersi dal progetto OSCAR, primo studio a valutare le performances del test genotipico utilizzando il Trofile ESTA come riferimento in una ampia coorte di pazienti (Studio OSCAR), e le prospettive future dell'impiego del DNA provirale per la valutazione del tropismo virale nel paziente virosoppresso o con viremia residua: sono stati questi gli argomenti al centro della Sessione "CCR5 e tropismo virale" del 4° Expert Panel Workshop di Bari, dedicato allo stato dell'arte su ricerca e clinica dell'infezione da HIV, alla luce dei risultati ottenuti con gli inibitori del CCR5.

## Le modificazioni del tropismo di HIV-1 nella storia naturale dell'infezione da HIV

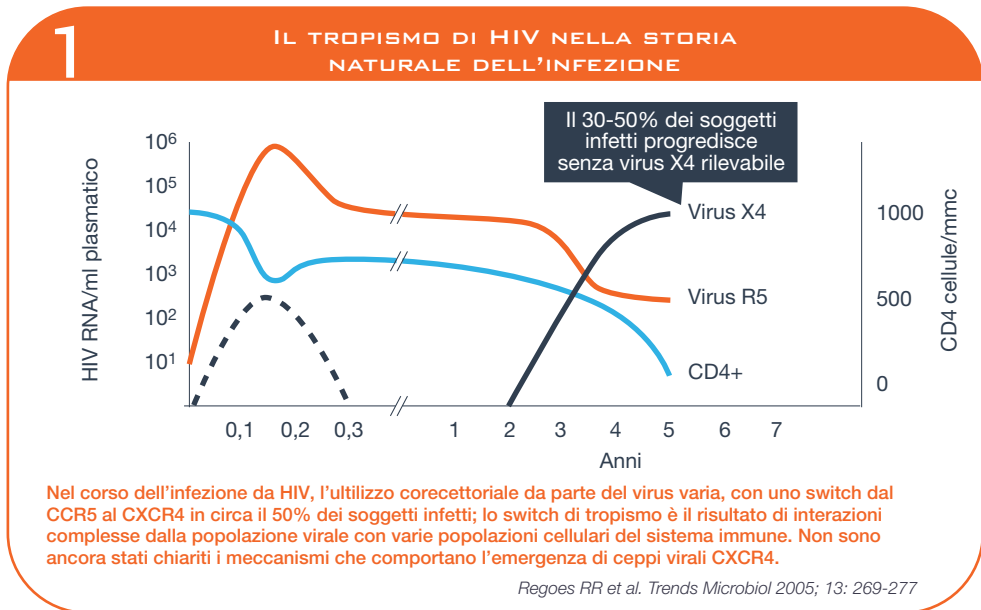
Nel corso della storia naturale dell'infezione da HIV, il virus utilizza corecettori diversi per la fase di entry virale: si verifica nel tempo uno *switch* da un fenotipo non sincizante (NSI o R5) ad un fenotipo sincizante (SI, o X4) e, quindi, dall'utilizzo del corecettore CCR5 al corecettore CXCR4 (1,2).

Alcune varianti virali utilizzano entrambi i recettori e vengono definite dual-tropiche o R5/X4 (3).

Il corecettore CCR5 è il corecettore principale utilizzato dal virus HIV, l'unico ad es-

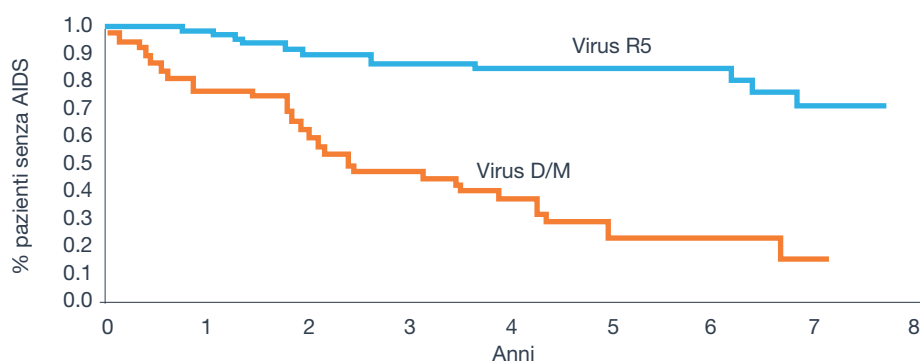
sere trasmesso efficientemente e per questo oggi riguarda la quasi totalità di infezioni trasmesse per via sessuale (4).

**IL CORECETTORE CCR5 È IL PRINCIPALE UTILIZZATO DAL VIRUS HIV: CEPPI VIRALI R5 PREDOMINANO NELLE PRIME FASI DELL'INFEZIONE**



Il test genotipico: implicazioni virologiche e cliniche

2

IL TROPISMO BASALE CORRELA  
CON LA PROGRESSIONE CLINICA

Curve Kaplan-Meier che mostrano la progressione dell'AIDS nei pazienti con virus R5 o D/M. L'analisi del tropismo al basale, misurato in 126 soggetti, mostra che il virus dual/mixed (D/M) è associato ad una conta basale più bassa di CD4 e a livelli più alti di HIV-RNA. La presenza di un virus D/M al basale si associa con un rischio di progressione verso l'AIDS 3,8 volte più alto.

Daar ES, et al. ICAAC 2003. Abstract 1722 c - Daar ES, et al. Clin Infect Dis. 2007; 45: 643-649

LE CARATTERISTICHE  
DEL TROPISMO  
DEL VIRUS HIV  
FANNO ASSUMERE  
AL TEST UN RUOLO  
CENTRALE NELLA  
PRATICA CLINICA

I ceppi virali R5-tropici sono in grado di infettare cellule dendritiche, macrofagi e cellule T (2) e predominano nelle prime fasi dell'infezione da HIV (5).

La frequenza di virus R5 si riduce progressivamente con il progredire dell'infezione da HIV (figura 1): nei pazienti *naive* è prevalente il fenotipo R5, mentre la prevalenza di ceppi R5/X4 o X4 è aumentata nei pazienti trattati, in relazione al grado di fallimento della terapia (6-9).

È stato evidenziato che popolazioni virali R5, X4 o R5/X4 sono presenti fin dall'inizio dell'infezione in percentuali diverse e che il tropismo esprime la quasi specie virale più rappresentata (5): oggi si pensa che sia la progressione stessa dell'infezione e quindi il maggior grado di immunodeplezione, a selezionare ceppi virali X4 (10).

Lo *switch* corecettoriale è un fenomeno complesso,

raro, che richiede numerose variazioni della gp120 (11).

La presenza di virus X4 è di per sé correlata ad un rischio di evoluzione più rapida (12,13) (figura 2), esponendo, inoltre, ad un rischio maggiore di progressione ad AIDS ed immunodeplezione (14).

Dati recenti indicano che, a livello di reservoir, la stessa HAART favorisce la selezione di questi virus (15), con una tendenza ad archiviare più frequentemente ceppi X4 (16).

La caratteristica del tropismo del virus HIV, che come è stato già ribadito, cambia di-

namicamente nel tempo (17), in cui in un certo momento si manifesta una maggior espressione di un virus piuttosto che di un altro, ha indicato la possibilità di ottenere l'eliminazione del virus R5-tropico, mediante utilizzo degli inibitori del corecettore come maraviroc, facendo assumere ai test per il tropismo un ruolo sempre più importante nella pratica clinica.

### I test per il tropismo virale

Tutte le linee guida internazionali, compreso il più recente documento italiano (18), raccomandano il test per la determinazione del tropismo corecettoriale ogni qualvolta venga preso in considerazione l'uso di maraviroc (AI), riconoscendo che la determinazione del tropismo è oggi cruciale per identificare i pazienti che possono giovare del trattamento con questa molecola.

È stato dimostrato che maraviroc, interagendo con il corecettore CCR5, è in grado di bloccare l'ingresso nella cellula dei ceppi virali con tropismo R5, senza alterare la funzionalità del recettore.

Finora la determinazione del tropismo veniva eseguita mediante test fenotipici, tra cui il più comunemente utilizzato era il Trofile.

Benché questo test sia caratterizzato da un'alta sensibilità per i ceppi X4 (0.3%), presenta però numerosi svantaggi: un lungo intervallo di tempo tra invio del campione e arrivo del risultato (i dati vengono, infatti, analizzati negli Stati Uniti), una resa poco soddisfacente per i campioni a bassa viremia (inferiore a 1000 copie/ml), non potendo essere utilizzato, quindi, in caso di fallimento virologico a bassa viremia, e i costi elevati.

## I vantaggi del test genotipico e il suo uso nella pratica clinica: i risultati dello studio OSCAR

È recente la raccomandazione di utilizzo, sia a livello italiano che europeo (18,19), del test genotipico, che analizza la sequenza V3 del gene che codifica per la proteina gp120, regione che svolge un ruolo chiave nel legame con il recettore: i maggiori determinanti dell'interazione tra HIV1 e i corecettori R5 e X4 sono, infatti, localizzati nel terzo loop ipervariabile della gp120 (20-23), anche se anche altre regioni ipervariabili di env possono influenzare il tropismo di HIV (24,25).

Per superare il limite di potere risolutivo che caratterizza le metodiche di sequenziamento di popolazione, sono state sviluppate diverse soluzioni tra cui il test su replicati, che basandosi sull'analisi di più aliquote di RNA plasmatico, ha aumentato la frequenza di identificazione dei ceppi X4 intorno al 10%.

Le linee guida europee raccomandano l'utilizzo dell'algoritmo interpretativo Geno2Pheno, con un livello di *cut-off* di 10% FPR (*false positive rate*). Il valore FPR si riferisce alla probabilità che il risultato di tropismo CXCR4 sia un falso positivo. In questo senso tanto maggiore è il valore FPR, quanto maggiore è la probabilità che la sequenza predica un tropismo CCR5 (19). Il test genotipico, oltre a rappresentare una valida e riconosciuta alternativa ai test fenotipici, presenta rispetto a questi ultimi una serie di vantaggi (maggiore facilità di esecuzione, attendibilità, rapidità di esecuzione ad un costo inferiore, eseguibilità nella routine clinica come il test per le resistenze), e quindi viene preferito nelle attuali linee guida Italiane (figura 3).

Diversi studi hanno dimostrato il valore predittivo del tropismo virale da parte del test genotipico, con una sensibilità e specificità riguardo ai virus X4 o dual/mixed simile a quella del Trofile (26, 27). A differenza del test fenotipico che presenta un'elevata sensibilità (indice della concordanza nel rilevare i virus dual mixed/X4), il test genotipico presenta un'elevata specificità, e quindi identifica i virus R5, predicendo in modo affidabile la risposta agli antagonisti del CCR5 come maraviroc (figura 4).

Numerosi studi, che hanno confrontato i risultati dei test genotipici del tropismo con quelli

ottenuti con il test Trofile o con altre metodiche fenotipiche, hanno dimostrato una buona compatibilità delle due metodiche.

In alcuni Paesi Europei sono state eseguite analisi per validare l'affidabilità della determinazione del tropismo su base genotipica. In linea con tali dati europei, risultano essere i risultati del Progetto OSCAR che, grazie ad una stretta collaborazione tra 16 centri clinici e virologici, ha messo a punto, condiviso e validato una nuova metodica per il sequenziamento del V3 (28).

La nuova metodica ha ottenuto una resa pari all'80% nei campioni con viremie comprese tra 500 e 1000 copie/ml e superiore al 90% per viremie superiori a 1000 copie/ml. Lo studio OSCAR (28) è stato il primo

A DIFFERENZA DEL TEST FENOTIPICO, IL TEST GENOTIPICO HA UN'ELEVATA SPECIFICITÀ E IDENTIFICA I VIRUS R5, PREDICENDO LA RISPOSTA A MARAVIROC

**3** CARATTERISTICHE DEL TEST GENOTIPICO E FENOTIPICO PER IL TROPISMO

<p><b>Test genotipico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ <b>Determinazione</b> del tropismo anche con viremia &lt;1,000 copie/ml</li> <li>■ <b>Poco costoso</b></li> <li>■ Tempo di esecuzione <b>breve</b></li> </ul>	<p><b>Test fenotipico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ <b>No determinazione</b> del tropismo anche con viremia &lt;1,000 copie/ml</li> <li>■ <b>Costoso</b></li> <li>■ Tempo di esecuzione <b>più lungo</b></li> </ul>
--	--

**4** TEST GENOTIPICO E FENOTIPICO PER IL TROPISMO DI HIV-1: DUE DIVERSI APPROCCI IN GRADO DI PREDIRE LA RISPOSTA VIROLOGICA A MARAVIROC

<p><b>Test genotipico</b></p> <p>↓</p> <p><b>Specificità</b> Concordanza nel rilevare i virus R5</p>	<p><b>Test fenotipico Trofile</b></p> <p>↓</p> <p><b>Sensibilità</b> Concordanza nel rilevare i virus dual mixed/X4</p>
--	---

Harrigan PR et al. 5th IAS 2009. Abs WELBA101

5

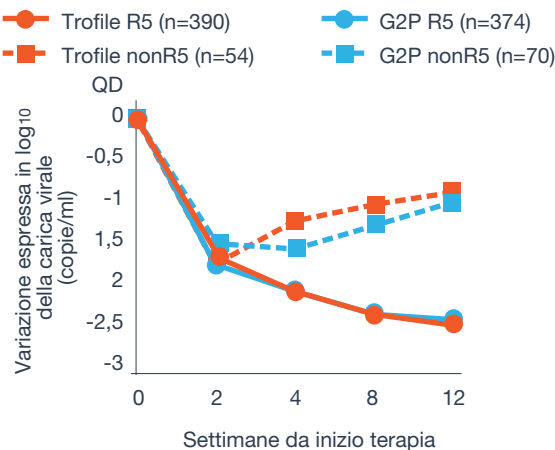
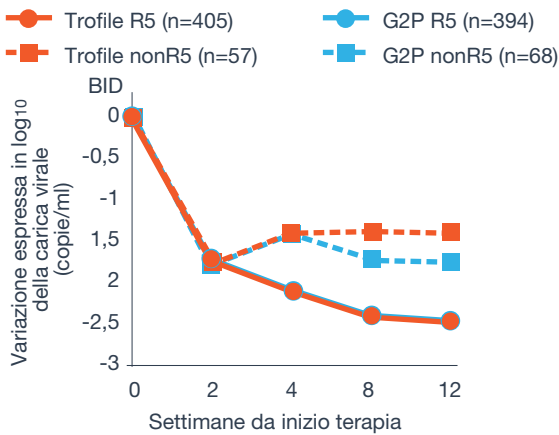
STUDIO OSCAR: CONCORDANZA TRA TEST GENOTIPICO E TEST FENOTIPICO E SPECIFICITÀ DEL TEST GENOTIPICO

Algoritmo Geno2Pheno		ESTA			Totale	Concordanza %	Sensibilità (IC 95%)	Specificità (IC 95%)	Accuratezza (IC 95%)
		R5	D/M	X4					
<b>Sottotipo B</b>									
FPR 5%	R5	195	50	1	246	80.5	0.49 (0.39-0.59)	0.96 (0.93-0.99)	0.72 (0.65-0.78)
	X4	8	43	6	57				
	Totale	203	93	7	303				
FPR 10%	R5	180	44	1	225	77.6	0.55	0.89 (0.45-0.65)	0.72 (0.84-0.93)
	X4	23	49	6	78				
	Totale	203	93	7	303				
<b>Sottotipo non B</b>									
FPR 5%	R5	47	6	0	53	83.9	0.45 (0.16-0.75)	0.92 (0.85-0.99)	0.69 (0.49-0.88)
	X4	4	5	0	9				
	Totale	51	11	0	62				
FPR 10%	R5	44	4	0	48	82.3	0.64 (0.35-0.92)	0.86 (0.76-0.96)	0.75 (57-93)
	X4	7	7	0	14				
	Totale	51	11	0	62				

Svicher V et al. New Microbiologica 2010; 33: 195-206

6

IL TEST GENOTIPICO DEL TROPISMO È IN GRADO DI PREDIRE LA RISPOSTA VIROLOGICA A MVC COME IL TEST PROFILE



McGovern RA et al. AIDS 2010; 24: 2517-2525

LO STUDIO OSCAR HA CONFERMATO L'ELEVATA SPECIFICITÀ E AFFIDABILITÀ DEL TEST GENOTIPICO DEL TROPISMO NELLA PRATICA CLINICA

studio a valutare le *performances* del test genotipico utilizzando il Trofile ESTA come riferimento in una così ampia coorte di pazienti: lo studio ha, infatti, raccolto 406 sequenze del V3, ciascuna con il risultato di Trofile ESTA, dimostrando una concordanza tra ESTA e Geno2Pheno ad un FPR del 5% e del 10% rispettivamente dell'80.5% e del 77.6% (figura 5).

La specificità (che misura la concordanza tra ESTA e test genotipico nel rilevare i virus R5) è risultata del 96.0% e dell'89.0%, mentre la sensibilità (che misura la concordanza nel rilevare i virus dual mixed/X4) è risultata del 49% e del 55% con un FPR rispettivamente del 5% e del 10% (figura 5), in linea quindi con i risultati della letteratura internazionale, che confermano una elevata specificità e affidabilità del test genotipico per la determinazione del tropismo virale nella pratica clinica (29).

Da ricordare che nello studio OSCAR il test genotipico è riuscito a determinare il tropismo di HIV anche nei campioni in cui il test ESTA aveva dato esito negativo (viremia < 1000 copie/ml).

Il nuovo test genotipico è oggi di uso corrente nei principali centri clinici sparsi sul territorio italiano, che coprono una percentuale molto rilevante dei pazienti con infezione da HIV che necessitano di terapia antivirale; ad essi è possibile fare riferimento per l'esecuzione del test, in modo analogo all'esecuzione del test di resistenza.

Qualora si ipotizzi di impostare una terapia basata su maraviroc, poiché i laboratori di riferimento sono gli stessi che eseguono il test di resistenza, è possibile ottenere allo stesso tempo i risultati, conseguendo in tal modo subito tutti gli elementi su cui basare le scelte per lo schema terapeutico.

**Risvolti clinici: dagli studi internazionali alla fase clinica dello studio OSCAR**

Di recente diversi studi clinici hanno validato il test genotipico per il tropismo nella pratica clinica quotidiana, in grado di identificare i pazienti candidati al trattamento con maraviroc (29, 30).

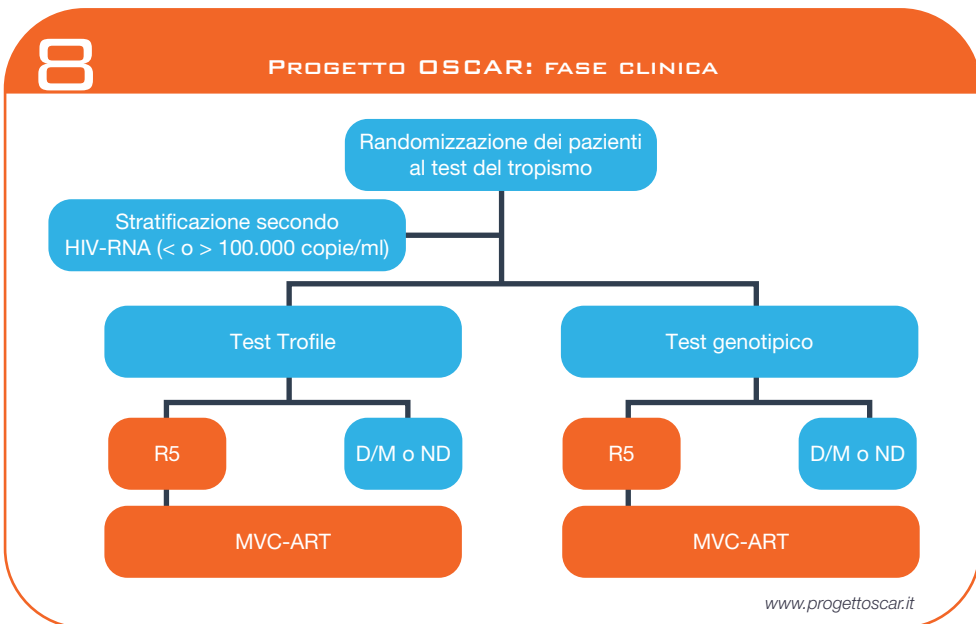
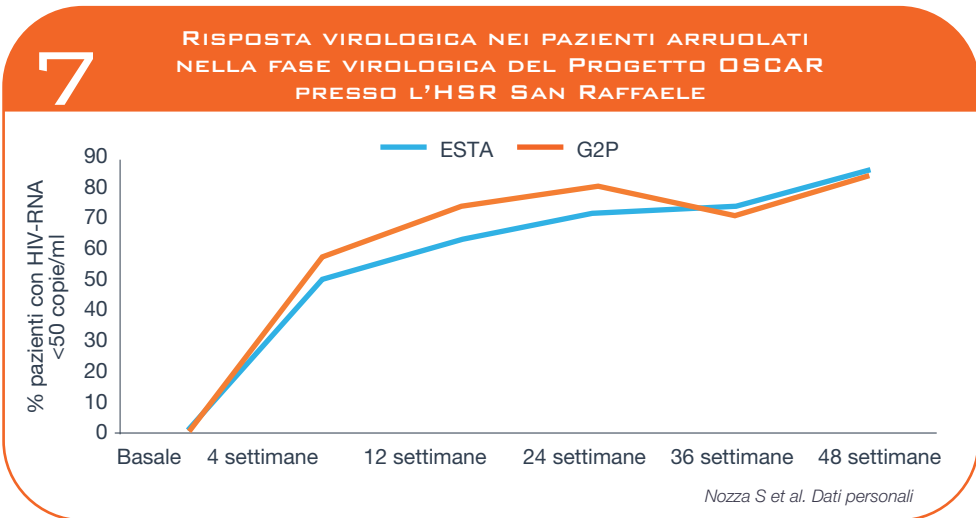
L'attendibilità nel predire la risposta a maraviroc è stata stabilita in pazienti esperien- ced nell'analisi retrospettiva dei campioni dei pazienti degli studi MOTIVATE e A4001029 (30): l'efficacia vi- rologica a 12 settimane pre- detta dal test fenotipico è stata confermata in modo affidabile dal test genotipico (figura 6) (31).

Nel corso della fase virologica dello studio OSCAR, i dati retrospettivi, relativi a 58 pazienti arruolati presso l'HSR San Raffaele di Mi- lano, hanno mostrato una curva di risposta virologica perfettamente sovrapponi- bile sia che la rilevazione del tropismo per R5 fosse stata eseguita con test ESTA che con test genotipico.

Tutti questi pazienti sono stati trattati con maraviroc (figura 7) (32).

Completata la fase virologica dello studio OSCAR, è

LA FASE CLINICA DELLO STUDIO OSCAR VALUTA L'EFFETTO DI MARAVIROC DOPO UTILIZZO DEL TEST GENOTIPICO O FENOTIPICO



Il test genotipico: implicazioni virologiche e cliniche

LO STUDIO DIVA SVILUPPERÀ UN TEST GENOTIPICO STANDARDIZZATO PER IL TROPISMO SU DNA PROVIRALE

ora in corso la fase clinica. Per valutare l'effetto di maraviroc dopo utilizzo del test genotipico o fenotipico, nella fase clinica dello studio OSCAR verranno confrontate le risposte virologiche a 48 settimane dei due gruppi di pazienti, randomizzati 1:1 al test genotipico (braccio A) o al test Trofile (braccio B) e, in caso di determinazione di virus R5, trattati con maraviroc + OBT (figura 8) (33).

L'endpoint primario è la proporzione di pazienti con viremia non rilevabile (< 50 copie/ml) dopo 48 settimane di terapia con maraviroc + OBT, diversi gli end point secondari: tempo al rebound virologico, variazioni immunologiche a livello di CD4 e CD8, proporzione di pazienti con eventi avversi di tipo clinico e di laboratorio, proporzione di pazienti con risultato non determinato ai due test. In ogni braccio verranno inclusi 122 pazienti, su un totale di 305 screenati.

I criteri di inclusione prevedono il fallimento della HAART in corso, un HIV-RNA > 500 copie/ml ed un GSS>1.

### La valutazione del tropismo virale nel paziente virosoppresso o con viremia residua: il test genotipico su DNA provirale

Oltre ai vantaggi di facilità di esecuzione, minor costo e maggior rapidità, i test genotipici permettono di ottenere informazioni anche su campioni a bassa carica virale e possono essere utilizzati sia su campioni di plasma, che su cellule mononucleate del sangue periferico (con amplificazione del DNA provirale), dimostrandosi quindi ideali per quei pazienti in cui la viremia non sia rilevabile e per i quali sia indicata una strategia di *switch* terapeutico.

Il profilo di *safety* di maraviroc, il basso tasso di resistenze, la capacità di modulare la risposta infiamma-

## 9 IL NETWORK DEL PROGETTO DIVA



## 10 DISEGNO DELLO STUDIO DIVA

Messa a punto e ottimizzazione della metodica di sequenziamento di V3 su DNA provirale



Condivisione della metodologia di sequenziamento di V3 tra tutti i centri clinici e virologici



Valutazione e definizione dei fattori correlati al tropismo di HIV-1 nel DNA provirale di pazienti con viremia non rilevabile



Uso del test genotipico per la determinazione del tropismo nel DNA provirale per predire la risposta virologica a maraviroc

Parte virologica

Parte clinica

toria, lo indicherebbero come una valida alternativa nel setting dello *switch* o delle strategie di semplificazione nei pazienti virosoppressi (34).

In questo senso è cruciale la disponibilità di un test rapido e poco costoso, come quello genotipico, in grado di determinare il tropismo nel DNA provirale, per riuscire, quindi, ad ottimizzare l'utilizzo di maraviroc nella pratica clinica.

Diversi studi hanno determinato il tropismo virale di HIV nel DNA provirale e come popolazione hanno arruolato pazienti viremici (35-37), suggerendo la buona correlazione tra stime del tropismo eseguite su RNA o

IL TEST GENOTIPICO PER IL TROPISMO SU DNA PROVIRALE OTTIMIZZERÀ L'USO DI MARAVIROC NELLO SWITCH O NELLA SEMPLIFICAZIONE NEI PAZIENTI VIROSOPPRESSI

DNA con test genotipico.

Di recente, alcuni autori hanno valutato i fattori associati con il tropismo nel DNA provirale in pazienti virosoppressi, evidenziando che il 70% di 140 soggetti virosoppressi nel plasma aveva un virus R5-tropico a livello provirale. I virus DM o X4 (30% di 140) erano presenti in tutte le categorie di nadir di CD4 (38). In Italia, ha ultimamente preso il via il Progetto DIVA (*DNA Tropism Italian Validation Concerted Action*), con

l'obiettivo di sviluppare un test genotipico standardizzato per la determinazione del tropismo su DNA virale, condiviso da clinici e virologi.

Il Network DIVA includerà numerosi centri clinici italiani (**figura 9**).

Il Progetto si articola in una parte virologica propeudeutica ad una clinica (**figura 10**).

La parte virologica è suddivisa in diverse fasi: messa a punto e ottimizzazione della metodica di sequenziamento del V3 su DNA virale, diffusione del protocollo di sequenziamento del V3 a tutti i centri coinvolti, valutazione e definizione dei fattori che influenzano il tropismo di HIV su DNA virale.

La successiva parte clinica del progetto avrà l'obiettivo di valutare come l'uso del test genotipico per la determinazione del tropismo su DNA provirale (utilizzando il test G2P con un FPR del 20%), possa predire la risposta virologica a maraviroc.

Verrà valutata la percentuale di pazienti con viremia ancora undetectable dopo 48 settimane di trattamento con 2NRTI + maraviroc in confronto ai pazienti in terapia HAART, fornendo, quindi, un rationale scientifico all'utilizzo di maraviroc nelle strategie terapeutiche (come ad esempio induzione- mantenimento) nei pazienti virosoppressi.

1. Feng Y. HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science* 10 May 1996; 872-877
2. Berger EA et al. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:657-700
3. Glushakova S et al. Preferential coreceptor utilization and cytopathicity by dual-tropic HIV-1 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Clin Invest.* 1999 Sep;104(5):R7-R11
4. Moore JP et al. The CCR5 and CXCR4 Coreceptors—Central to Understanding the Transmission and Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20(1): 111-126
5. Regoes RR, Bonhoeffer S. The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends in Microbiology* 2005; 13: 269-277
6. Schuitemaker H et al. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992; 66(3): 1354-60
7. Brumme ZL et al. Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. *J Infect Dis* 2005; 192(3): 466-74. Epub 2005 Jun 23
8. Wilkin TJ et al. HIV type 1 chemokine coreceptor use among antiretroviral-experienced patients screened for a clinical trial of a CCR5 inhibitor: AIDS Clinical Trial Group A5211. *Clin Infect Dis.* 2007 Feb 15; 44(4): 591-5
9. Hunt PW et al. Prevalence of CXCR4 tropism among antiretroviral-treated HIV-1-infected patients with detectable viremia. *J Infect Dis.* 2006; 194(7): 926-30
10. Delobel P et al. Naive T-cell depletion related to infection by X4 human immunodeficiency virus type 1 in poor immunological responders to highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2006; 80: 10229-10236
11. de Jong JJ et al. Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J Virol* 1992; 66(2): 757-65
12. Raymond S et al. CXCR4-using viruses in plasma and peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression. *AIDS* 2010; 24(15): 2305-12

13. Daar ES et al. Baseline HIV type 1 coreceptor tropism predicts disease progression. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 643-649
14. Sarmati L et al. Switching of inferred tropism caused by HIV during interruption of antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2010; 48(7): 2586-8. Epub 2010 May 19
15. Delobel P et al. R5 to X4 switch of the predominant HIV-1 population in cellular reservoirs during effective highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 38: 382-392
16. Verhofstede C et al. CXCR4-using HIV type 1 variants are more commonly found in peripheral blood mononuclear cell DNA than in plasma RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 50(2): 126-36
17. Shepherd JC et al. Emergence and persistence of CXCR4-tropic HIV-1 in a population of men from the multicenter AIDS cohort study. *J Infect Dis* 2008; 198(8): 1104-12
18. Linee Guida italiane sull'utilizzo degli antiretrovirali nelle persone con infezione HIV - 15 luglio 2010. [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_1301\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1301_allegato.pdf). Ultimo accesso in data 21 dicembre 2010
19. Vandekerckhove LPR et al. Consensus statement of the European guidelines on clinical management of HIV-1 tropism testing. *J AIDS Society* 2010; 13 (Suppl 4): O7
20. Jensen MA et al. Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev* 2003; 5: 104-112
21. Delobel P et al. Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quaspecies. *J Clin Microbiol* 2007; 45(5): 1572-80
22. Skrabal K et al. Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J Clin Microbiol* 2007
23. Hwang SS et al. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 1991; 253(5015): 71-4
24. Andeweg AC et al. Both the V2 and V3 regions of the human immunodeficiency virus type 1 surface glycoprotein functionally interact with other envelope regions in syncytium formation. *J Virol* 1993; 67(6): 3232-9
25. Boyd MT et al. A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism. *J Virol*. 1993; 67(6): 3649-52
26. Recordon-Pinson et al. Evaluation of the genotypic prediction of HIV-1 coreceptor use versus a phenotypic assay and correlation with the virological response to maraviroc: the ANRS GenoTropism study. *AAC2010*, p 3335-3340
27. Poveda E. Genotypic determination of HIV tropism - clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists. *AIDS Rev*.2010;12(3):135-48. Review
28. Svicher et al. Performance of genotypic tropism testing in clinical practice using the enhanced sensitivity version of Trofile as reference assay: results from the OSCAR Study Group. *New Microbiologica* 33, 195-206, 2010
29. Harrigan PR et al. Screening for HIV tropism using population-based V3 genotypic analysis: a retrospective virological outcome analysis using stored plasma screening samples from MOTIVATE-1. *IAS 2009, Abs WELBA101*
30. McGovern R et al. Population-based sequencing of the V3-loop is comparable to the enhanced sensitivity trofile assay in predicting virological response to maraviroc of treatment-naive patients in the MERIT trial. *CROI 2010, Abstract 92*
31. McGovern RA. Population-based V3 genotypic tropism assay: a retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies. *AIDS* 2010; 24(16): 2517-25
32. Nozza S et al. Dati personali
33. Protocollo clinico studio OSCAR sito Progetto OSCAR. <http://www.progettooscar.it>
34. Wilkin T et al. ACTG 5256 Maraviroc intensification for suboptimal CD4+ cell response despite sustained virologic suppression. 17 CROI 2010 abstract 285
35. Verhofstede C et al. CXCR4-using HIV type 1 variants are more commonly found in peripheral blood mononuclear cell DNA than in plasma RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 50(2): 126-36
36. Swenson LC et al. Improved detection of CXCR4-using HIV by V3 genotyping: application of population-based and "deep" sequencing to plasma RNA and proviral DNA. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; 54(5): 506-10
37. Seclén E. Dynamics of HIV tropism under suppressive antiretroviral therapy: implications for tropism testing in subjects with undetectable viraemia. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(7):1493-6. Epub 2010 May 20
38. Souliè C et al. Factors associated with proviral DNA HIV-1 tropism in antiretroviral therapy-treated patients with fully suppressed plasma HIV viral load: implications for the clinical use of CCR5 antagonists. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(4): 749-51. Epub 2010 Feb 11



