

## Revisione percorso diagnostico HIV (rev 3, 2014).

Coordinatore:

**Maria R. Capobianchi**, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “L. Spallanzani”, Roma

Con la collaborazione di:

**Isabella Abbate**, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “L. Spallanzani”, Roma

**Maria Carla Re**, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna Scuola di Medicina (per la SIVIM)

**Andrea Antinori**, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “L. Spallanzani”, Roma (per la SIMIT)

### Introduzione

L'HIV è un Retrovirus, cioè un virus a RNA che, grazie all'enzima trascrittasi inversa, inserisce il suo genoma, in forma di DNA (provirus), nel genoma della cellula ospite. Le principali cellule bersaglio dell'infezione sono i linfociti T CD4, la cui deplezione è il meccanismo fondamentale alla base dell'immunodeficienza progressiva che accompagna l'infezione. Mentre le cellule T CD4 attivate vengono uccise dall'infezione, nelle cellule non attivate (*resting*) l'HIV può rimanere allo stato di provirus latente e persistere anche in presenza di soppressione della replicazione virale determinata dalla somministrazione di farmaci antiretrovirali. Oltre ai linfociti CD4, molte altre cellule del sangue (es. macrofagi) e di altri tessuti (es. cellule endoteliali) possono ospitare l'infezione e fungere da reservoir virali. Come in tutte le infezioni persistenti, la risposta immunitaria che si sviluppa nei soggetti infetti non è protettiva.

Sono stati identificati due tipi di HIV (HIV-1 e HIV-2). Di entrambi i tipi, oggi conosciamo numerosi sottotipi e molte forme ricombinanti.

HIV-1 è responsabile della grande maggioranza delle infezioni. HIV-2 appare meno efficiente di HIV-1 nella trasmissione e ha determinato una epidemia ristretta principalmente all'Africa occidentale.

HIV-1 presenta 3 gruppi principali: “M” è il più diffuso; “O” ed “N” sono di più recente identificazione e sono diffusi prevalentemente nell'Africa centro-occidentale e solo eccezionalmente nel nostro paese.

L'infezione da HIV può essere schematicamente distinta in tre fasi: infezione primaria o acuta, fase di latenza clinica e fase clinicamente manifesta che culmina con la cosiddetta sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS).

L'infezione primaria è spesso asintomatica, ma in circa il 50% dei casi può presentarsi come malattia acuta, della durata di poche settimane, di tipo simil-influenzale; i sintomi più comuni sono linfadenopatia, eruzione cutanea, febbre, ulcere orali, cefalea, artralgie, mialgie, malessere diffuso. Possono essere presenti sintomi e manifestazioni cliniche concomitanti, quali meningite asettica o talora infezioni opportunistiche. Tale fase si associa ad elevata viremia e spesso precede la sierconversione. La fase dell'infezione che precede la comparsa dei marcatori di laboratorio viene indicata come “fase finestra”.

La fase di latenza clinica ha una durata variabile, anche di molti anni. Durante questa fase non si manifestano segni clinici, ma il virus continua a replicarsi, determinando una progressione verso la fase clinica. Tale progressione è accompagnata da progressiva deplezione dei linfociti CD4 e tende ad essere tanto più rapida quanto più elevata è l'attività replicativa virale.

Lo stadio AIDS si raggiunge quando il numero e la funzionalità dei linfociti T CD4 si riduce drasticamente ed è caratterizzato dalla comparsa di infezioni opportunistiche e neoplasie. Tale fase clinica, se non contrastata da terapia antiretrovirale e da trattamento specifico per le patologie opportunistiche, ha andamento ingravescente, fino a determinare l'exitus. L'AIDS può essere preceduto dalla comparsa di segni o sintomi e infezioni opportunistiche cosiddette minori.

La trasmissione dell'infezione da HIV avviene principalmente nei seguenti modi:

- per via sessuale
- per via ematica (scambio di siringhe, esposizione di mucose o lesioni cutanee a sangue, ecc.)
- per via verticale (dalla madre al figlio durante la gravidanza, al momento del parto o durante l'allattamento).

Per la terapia specifica anti-HIV, vengono utilizzati farmaci antiretrovirali, che hanno come bersaglio di azione diverse fasi della replicazione virale e vengono raggruppati nelle seguenti classi: inibitori della trascrittasi inversa, inibitori della proteasi, inibitori dell'integrasi, inibitori della fusione.

Una classe più recente di farmaci, diretta verso molecole cellulari, agisce inibendo l'interazione fra il virus e il co-recettore cellulare (CCR5). Le terapie antiretrovirali si basano sulla combinazione di farmaci appartenenti a più classi (cART), in modo da contrastare con maggiore efficacia l'insorgenza di farmacoresistenza.

Una diagnosi precoce ed accurata dell'infezione da HIV è importante sia perché il paziente può beneficiare della terapia durante le prime fasi dell'infezione, sia perché il recupero immunologico risulta essere molto più efficace. Poiché è stato dimostrato che la trasmissione dell'infezione, attraverso rapporti sessuali non protetti, è quasi totalmente abolita quando la carica virale nel partner positivo è azzerata, il trattamento precoce ha come effetto la riduzione del contagio dei partners sessuali sieronegativi (*treatment as prevention*).

In Figura 1 è riportata in modo schematico la cinetica di comparsa dei marcatori viro-immunologici dell'infezione da HIV su cui si basano i vari algoritmi diagnostici atti ad evidenziare l'infezione in tutte le sue fasi. L'utilizzo delle prestazioni disponibili per la diagnosi sia sierologica che virologica, differenziato sulla base del sospetto diagnostico, può essere schematizzato come segue.

### **Diagnosi di infezione cronica nell'adulto.**

La diagnosi di infezione cronica da HIV-1 è basata sulla rilevazione di anticorpi specifici (test di screening), seguito da un test di conferma (Western- o Immuno-Blot), secondo le modalità previste dal documento di consenso sulle politiche di offerta e le modalità di esecuzione del test per HIV in Italia (Rep. N. 134/CSR del 27 luglio 2011) (11A11001) (G.U. Serie Generale n. 191 del 18 agosto 2011). Come test di screening vengono raccomandati i saggi immunoenzimatici di quarta generazione, che associano la rilevazione di antigeni virali a quella degli anticorpi. Questa formulazione permette di rilevare la presenza di infezione anche nei casi in cui gli anticorpi non si siano ancora formati (infezione primaria) o nelle fasi avanzate dell'infezione in cui la profonda immunosoppressione si accompagna alla perdita degli anticorpi. Nei casi in cui non sia possibile basarsi sugli anticorpi specifici, la rilevazione di acidi nucleici, o, meno frequentemente, di antigeni virali (p24), viene utilizzata per la conferma di diagnosi. I test di conferma permettono di distinguere le infezioni da HIV-1 da quelle da HIV-2.

I test di quarta generazione sono fortemente raccomandati nello specifico ambito europeo sin dal 2008, in quanto, rispetto ai test di terza generazione, riducono sensibilmente la finestra diagnostica tra il momento dell'infezione e la prima positività dei test sierologici (Figura 2). Si stima che con i test di quarta generazione la fase finestra duri poco più di 2 settimane dall'acquisizione dell'infezione e fino a circa 5-7 giorni dopo la rilevabilità dei genomi virali nel sangue periferico.

Se il test di screening risulta negativo, il campione è considerato negativo per la presenza di anticorpi anti-HIV. Nei soggetti che si trovano nella fase finestra (prima della sierconversione) o nella fase finale della malattia, la ricerca di anticorpi anti-HIV può dare esito negativo o *borderline* e per una corretta interpretazione del risultato è opportuno considerare la possibilità di una infezione primaria (vedi diagnosi di infezione primaria). Se il risultato del primo test di *screening* è dubbio o positivo, è necessario eseguire un secondo test di *screening*, preferibilmente con un metodo diverso, di sensibilità almeno equivalente al primo, ed un test di conferma.

Nei casi di positività confermata, molte linee guida (consultabili nei siti web di seguito indicati) suggeriscono di ripetere il test sierologico su un secondo campione prelevato successivamente, al fine di escludere un errore di identificazione del paziente. Tale orientamento rientra nelle valutazioni del *counselling* post-test (vedi punti successivi) ed è regolamentato da disposizioni locali.

I test di *screening* in commercio in Italia non consentono di differenziare l'infezione da HIV-1 e HIV-2. I test di conferma WB/IB presenti in commercio permettono il riconoscimento delle specificità anticorpali dirette verso i vari antigeni virali ed in genere sono specifici per HIV-1 e/o HIV-2; esistono test che permettono la contemporanea evidenziazione di bande per HIV-1 e HIV-2. Di recente si sono resi disponibili in commercio test di conferma rapidi, capaci di distinguere le reattività anticorpali per

HIV-1 e HIV-2 dirette verso numerose e diverse specificità antigeniche dei due virus. La semplicità di uso e le *performance* generalmente buone consentono di ridurre la complessità dei test ed i tempi di attesa che finora hanno caratterizzato la conferma sierologica.

I soggetti con infezione da HIV-2, rari nel nostro Paese, in genere presentano reattività ai test di *screening* ed un quadro indeterminato al test di conferma (WB/IB) specifico per HIV-1, con assenza di bande per gp120/gp160 e gp41. Un test WB/IB specifico per l'HIV-2 ad oggi è eseguito soltanto in caso di sospetto epidemiologico (provenienza del paziente da regioni ad alta endemia di HIV-2, quali l'Africa occidentale) e/o per la presenza di un quadro di WB per HIV-1 indeterminato, caratterizzato da assenza di reattività ai prodotti del gene *env*.

Il risultato del test di conferma WB/IB può essere positivo, negativo o indeterminato. I criteri interpretativi si basano sulla presenza di reattività contro i vari antigeni virali, prevedendo un minimo di due bande reattive per ritenere positivo un risultato: secondo il criterio dell'OMS, un test di conferma per HIV-1 è positivo se vi sono almeno due bande specifiche per i prodotti del gene *env* (gp120/160 o gp41), accompagnati o meno da bande specifiche per i prodotti del gene *gag* (p55 o p24 o p17) e del gene *pol* (p68 o p53 o p32); secondo il criterio dei CDC, la positività viene definita dalla presenza di almeno due tra le seguenti bande: p24, gp41 e gp120/160; il criterio dell'FDA è più restrittivo e prevede la presenza di almeno tre bande (gp120/160 o gp41+p32+p24). I risultati che presentano una sola banda reattiva, o un numero di bande minore di quello richiesto per soddisfare il criterio di positività adottato, sono considerati indeterminati. I test che non presentano alcuna banda reattiva sono considerati negativi. E' È opportuno che nel referto venga indicato il criterio interpretativo utilizzato. Se il test di conferma è negativo e non vi è sospetto di infezione primaria, il risultato del test di *screening* può essere considerato falso positivo, ma è opportuno ripetere il saggio su un secondo prelievo per escludere un'eventuale sierconversione.

La combinazione dei test immunoenzimatici di *screening* e i test WB/IB di conferma garantisce una sensibilità e specificità di risultato estremamente elevata, con un valore predittivo positivo prossimo al 100%. Tuttavia l'evidenziazione degli anticorpi mediante WB/IB di conferma risulta più tardiva rispetto ai i test immunoenzimatici (circa 20 giorni dopo rispetto ai test di quarta generazione). Inoltre nell'interpretazione dei risultati è sempre opportuno ricordare che nessun test diagnostico fornisce risultati certi al 100% e quindi possono essere ottenuti risultati falsi positivi o falsi negativi, anche se rari, in dipendenza anche dalla prevalenza dell'infezione nella popolazione in oggetto.

A tutt'oggi algoritmi diagnostici disegnati secondo la suddetta tipologia possono presentare due punti di debolezza non trascurabili, quali la mancanza di un'efficace e sistematico riconoscimento delle infezioni primarie e delle infezioni sostenute da HIV-2. Nel nostro paese le infezioni primarie rappresentano, a seconda della popolazione in osservazione, fino al 10% delle nuove diagnosi, mentre le infezioni da HIV-2 non superano l'1% delle nuove diagnosi, anche se questo dato potrebbe essere sottostimato.

A seguito del progressivo miglioramento delle *performance* dei test di *screening*, in alcuni paesi sono stati proposti o adottati algoritmi diagnostici semplificati, basati su un doppio test di *screening* senza test di conferma; nei casi di discordanza fra i due test iniziali, viene eseguito un test aggiuntivo (HIV RNA) per mettere in evidenza possibili infezioni primarie. Nella revisione proposta nel 2010 dai CDC americani, in particolare, il secondo test di *screening* è in grado di discriminare fra HIV-1 e -2. .

In Italia, il test per la diagnosi di infezione da HIV è gratuito, soggetto a norme di confidenzialità, può essere eseguito in completo anonimato e non può essere effettuato senza il consenso informato dell'interessato.

Presso i centri dove viene effettuato il prelievo e la consegna del referto deve essere offerto il servizio di *counselling* (discussione) pre- e post-test. La discussione pre-test è essenziale per informare il paziente sul significato del test, sui suoi limiti e sulla interpretazione dei risultati, ed è il momento ideale per raccogliere il consenso informato. Non può essere consegnata al paziente alcuna risposta positiva senza un test di conferma e senza un adeguato *counselling* post-test. Si raccomanda che il centro che effettua il test di *screening* sia in grado di effettuare anche il test di conferma. Ciò garantisce anche una adeguata tempestività di risposta, che comunque dovrebbe essere contenuta entro e non oltre i 7-10 giorni dal prelievo. E' raccomandata la conservazione dei sieri, anche se vi sono notevoli

difficoltà logistiche per la necessità di spazi di laboratorio idonei dedicati e non è prevista al momento la rimborsabilità di tale attività. In alcune regioni (es. Lazio) la conservazione dei sieri positivi è obbligatoria.

Con i test più recenti la quasi totalità delle sier conversionsi si verifica entro un mese dall'esposizione. Il documento di consenso del 2011 fissa a 3 mesi il tempo massimo del periodo finestra. Tuttavia quando viene effettuata la profilassi post-esposizione, la sier conversione può essere ritardata; nel complesso, il set minimo di controlli post-esposizione dovrebbe comprendere prelievi a 3 e 6 mesi dopo l'esposizione. Se il paziente presenta sintomi di malattia compatibile con HIV ma risulta sieronegativo, è comunque consigliato un controllo più precoce e il paziente va riferito ad un centro specializzato. Il prolungamento del *follow up* sierologico oltre i 6 mesi è consigliato solo in casi particolari, quali quelli riguardanti soggetti immunodepressi ed il personale sanitario esposto ad coinfezione HIV + HCV, perché in tal caso la sier conversione per HIV può essere ritardata.

I soggetti con rischio continuato di trasmissione di HIV rappresentano una categoria a parte per quel che riguarda il *follow-up*: in tali casi è raccomandata l'esecuzione periodica del test HIV. In questo modo, è possibile monitorare lo stato sierologico del soggetto e mantenere i contatti per colloqui di *counselling* e prevenzione e intercettare tempestivamente le eventuali infezioni al loro esordio, tenendo presente che queste sono le fasi in cui l'efficienza della trasmissione è massima.

### **Offerta del test**

Nonostante studi epidemiologici dimostrino una bassa prevalenza di infezione nel nostro paese, oltre alle popolazioni classificate come "a rischio" il test dovrebbe essere incentivato e offerto a chiunque, indipendentemente dalla cosiddetta categoria di appartenenza

#### **Popolazioni ad alto rischio di infezione**

- Uomini che hanno rapporti sessuali con altri uomini (MSM)
- Eterosessuali con più partner sessuali negli ultimi 12 mesi
- Persone provenienti da paesi ad alta prevalenza di infezione, in particolare Africa sub-sahariana.
- Tossicodipendenti per via endovenosa (IDU)
- Adolescenti ed adulti durante la carcerazione.
- Soggetti che si prostituiscono
- Partner sessuali di soggetti HIV-positivi

#### **Circostanze specifiche, a prescindere dalla popolazione,**

- Donazione d'organo
- Programmazione o interruzione volontaria di gravidanza (il test va offerto anche al partner)
- Violenza sessuale.
- Sospetto o diagnosi di infezioni sessualmente trasmissibili
- Diagnosi di epatite virale trasmissibile sessualmente o per via ematica.
- Sospetto o diagnosi di tubercolosi

Il test in gravidanza va offerto attivamente a tutte le donne indipendentemente da ogni valutazione di rischio, perché la conoscenza del proprio stato di infezione permette di adottare efficaci misure di prevenzione della trasmissione verticale. Il personale che assiste le donne nelle strutture sede di parto deve verificare che la donna abbia eseguito un test per HIV durante la gravidanza e, nel caso ciò non fosse avvenuto, il test va effettuato con procedura d'urgenza.

### **Diagnosi di infezione primaria/acuta.**

Da un punto di vista di laboratorio il quadro dell'infezione primaria o acuta è caratterizzato dalla positività dei test virologici che rilevano la presenza del virus (antigene p24 e/o HIV RNA frequentemente superiore a 10.000 copie/mL) con negatività dei test sierologici di *screening* o positività al test di *screening* accompagnata da un quadro di WB/IB negativo o indeterminato.

Dopo la trasmissione, nel soggetto neoinfettato si verifica una prima fase, della durata di circa 10 giorni, denominata fase di eclisse, in cui il virus si replica nei siti anatomici primari di replicazione, ma non è ancora rilevabile nel sangue, nemmeno con i test molecolari che rilevano il genoma virale (HIV RNA), che sono i più sensibili a disposizione dell'armamentario diagnostico. Successivamente, i livelli di HIV RNA aumentano, raggiungendo un picco tra i 21 ed i 28 giorni, per poi decrescere e raggiungere un *plateau* ben definito dopo un periodo variabile da soggetto a soggetto, che mediamente dura circa 3 mesi, momento in cui si passa dalla fase acuta alla fase cronica precoce. In maniera leggermente differita rispetto all'RNA virale si rendono evidenti gli antigeni virali, in particolare l'antigene capsidico p24. Il ritardo si stima intorno ai 5-7 giorni ed è dovuto alla minore sensibilità dei test sierologici rispetto a quelli molecolari. I test di quarta generazione rilevano la presenza sia degli anticorpi che la p24, ma nella maggior parte dei casi non consentono di distinguere tra i due parametri. Come precedentemente accennato, nelle fasi precoci dell'infezione primaria un test combinato può risultare positivo, a causa della rilevazione della sola p24, ma in questo caso il risultato del test di conferma (WB/IB) sarà negativo o indeterminato.

In caso di test combinato positivo accompagnato da test di conferma negativo o indeterminato, va quindi considerata l'eventualità che il paziente si trovi nella fase di infezione acuta dove ancora non si sono sviluppati gli anticorpi specifici: in tal caso la diagnosi va confermata mediante ricerca sierologica di p24 (effettuabile anche sullo stesso prelievo del test di screening e confermabile con un test di neutralizzazione specifica) o mediante ricerca di HIV RNA nel plasma, da effettuare su un prelievo dedicato, con anticoagulanti diversi da eparina.

Va anche considerato che i test per la ricerca dell'RNA virale disponibili in Italia sono generalmente test quantitativi disegnati per il monitoraggio, non per la diagnosi, ed hanno una specificità relativamente bassa. Quindi, in considerazione della possibilità di risultati falsamente positivi, il ricorso routinario alla determinazione HIV RNA per la diagnosi "precoce" di infezione da HIV in popolazioni a bassa prevalenza e incidenza è sconsigliato, rimanendo l'indicazione solo per i casi di esposizione a rischio e di sospetta infezione acuta/primaria.

In ogni caso, è consigliabile che la diagnosi di infezione primaria da HIV venga successivamente confermata da un quadro completo di sieroconversione, che si ottiene con la positivizzazione del test di conferma (WB/IB) a distanza di una settimana o più. Da tempo negli Stati Uniti è disponibile un test qualitativo per la ricerca dell'RNA virale approvato per la diagnosi di infezione da HIV-1, inserito nell'algoritmo diagnostico proposto dai CDC nel 2010. Recentemente in Italia si sono resi disponibili test qualitativi per la ricerca di acidi nucleici di HIV, approvati per la diagnosi, ma il loro utilizzo è ancora limitato.

### **Diagnosi infezione recente.**

Il progressivo cambiamento del quadro epidemiologico negli ultimi anni, caratterizzato da un significativo aumento della trasmissione di HIV-1 mediante rapporti eterosessuali, e da un crescente numero di infezioni riscontrate in soggetti immigrati da Paesi in via di sviluppo, mette in evidenza l'importanza di conoscere il numero delle nuove infezioni, contemporaneamente alla possibilità di identificare i cosiddetti "*late presenter*".

La distinzione tra infezione recente e infezione progressiva rappresenta uno dei problemi di maggiore attualità nella infezione da HIV al fine di ottenere informazioni precise relativamente al periodo di incubazione, di fornire al clinico indicazioni cruciali per l'inizio della terapia e di controllare la diffusione dell'infezione.

Dati epidemiologici, inoltre, hanno sempre più frequentemente sottolineato che una percentuale variabile dal 40 a oltre il 50% di soggetti si presenta alla diagnosi in condizione di infezione tardiva, cioè con un livello di CD4 inferiore a 350 cell/ml<sup>3</sup>, evidenziando, ancora oggi, mancanza di consapevolezza e un grado di percezione del rischio estremamente basso.

Pertanto in caso di positività al test per la determinazione di anticorpi specifici nei confronti di HIV-1 e 2, con un quadro di positività completa delle bande del test di conferma, è utile stabilire il tempo intercorso tra il momento in cui è avvenuto il contagio e la diagnosi positiva di infezione. Infatti, una datazione dell'infezione potrebbe essere estremamente utile sia per scopi epidemiologici (conoscere l'incidenza delle nuove infezioni, i gruppi di popolazione maggiormente colpiti) sia per scopi di prevenzione (adattare gli interventi di comunicazione, di screening e le misure preventive all'epidemiologia locale) sia per scopi clinici (individuazione dei partner recenti, informazione sulla trasmissione di virus farmaco resistenti, etc).

Come si è detto, i test attualmente disponibili per la diagnosi di infezione da HIV, [ricerca di anticorpi con test di screening e di conferma, accompagnata eventualmente, in casi particolari, anche dalla determinazione del livello di replicazione di HIV (HIV-RNA)] discriminano solamente chi è infetto da chi non lo è, ma non permettono di stabilire il lasso di tempo intercorso dal momento dell'infezione fino al primo test che risulta positivo. Anche se oggi si può conoscere approssimativamente il numero delle persone che ogni anno in Italia si infettano con l'HIV (all'incirca 3.500 ogni anno), non è possibile distinguere i soggetti da poco infettatisi da chi invece ha contratto l'infezione in precedenza, magari da molti anni, senza mai saperlo fino al momento del test di screening.

Al momento non esistono test standardizzati, marcati per uso diagnostico, ma solamente test *home made* che permettono di stimare la durata dell'infezione. Tali test sono in realtà degli algoritmi, e sono indicati complessivamente *recent infection testing algorithm* (RITA). I più diffusi si basano sull'affinità degli anticorpi HIV-specifici. Infatti, durante il corso dell'infezione da HIV, così come in molte altre infezioni virali, l'avidità degli anticorpi (classe IgG) aumenta progressivamente nei mesi successivi all'infezione primaria, per mantenersi elevata nelle infezioni croniche; la determinazione dell'avidità degli anticorpi permette quindi di discriminare tra un'infezione recente ( $\leq 6$  mesi) e un'infezione presente da lungo tempo ( $> 6$  mesi), anche solo utilizzando un unico campione di sangue.

Negli ultimi tempi, fra i RITA si stanno valutando i test che misurano l'eterogeneità genetica del virus, che nel corso dell'infezione aumenta al pari dell'avidità. Tuttavia le valutazioni basate sull'eterogeneità genetica al momento sono limitate all'ambito della ricerca.

### **Diagnosi di infezione nel neonato nato da madre sieropositiva.**

La diagnosi nel neonato da madre HIV-positiva presenta notevole complessità e va eseguita presso centri specializzati. Infatti virtualmente tutti i neonati da madre sieropositiva sono essi stessi sieropositivi alla nascita e gli anticorpi materni possono persistere fino a 18 mesi di età; solo dopo tale periodo la loro presenza permette di porre diagnosi di infezione. Viceversa, la negativizzazione dei test sierologici dopo 6 mesi di età può essere utilizzata come dimostrazione di assenza di infezione.

Data la scarsa utilizzabilità dei test sierologici, fino a 18 mesi di età la diagnosi nel neonato è basata sulla determinazione degli acidi nucleici virali (HIV RNA o DNA provirale), o sulla ricerca dell'antigene p24 con test non combinato, dopo dissociazione degli immunocomplessi.

Va comunque, tenuto presente che, in base alle linee guida internazionali e nazionali, il neonato da madre HIV positiva è in genere sottoposto a protocollo terapeutico almeno per le prime 6 settimane di vita e l'effetto della terapia potrebbe portare a un livello non evidenziabile (*target not detectable*: TND) l'HIV RNA plasmatico. I test di elezione in questi casi si basano sulla la ricerca del DNA virale nei linfomonociti circolanti o sulla ricerca degli acidi nucleici virali totali (DNA+RNA). Mentre per il DNA provirale sono al momento disponibili soltanto metodi *in house*, per la ricerca di acidi nucleici totali (DNA+RNA) recentemente si sono resi disponibili test qualitativi, approvati per la diagnosi anche su sangue raccolto su supporto cartaceo, ma il loro utilizzo è ancora limitato.

Va infine ricordato che i neonati da madri sieropositive possono presentare alla nascita acidi nucleici di HIV dovuti alla presenza di vestigia cellulari di derivazione materna, la cui presenza scompare nel

tempo. D'altra parte è possibile che la positività agli acidi nucleici virali si manifesti dopo la nascita, dopo un primo test negativo. È opportuno, quindi, che, oltre che alla nascita, i neonati da madre sieropositiva eseguano almeno altri 2 test per la ricerca dei genomi virali, a 1 mese e a 4 mesi. La negatività a entrambi i tempi post-nascita depone per assenza di infezione. Il supporto sierologico definitivo, dopo i 18 mesi di età, è comunque consigliato.

### **Prestazioni diagnostiche disponibili per la stadiazione dell'infezione ed il monitoraggio delle terapie antiretrovirali:**

I parametri fondamentali per la stadiazione dell'infezione e per il monitoraggio delle terapie antiretrovirali sono la conta dei linfociti CD4, che riflette la compromissione del sistema immunitario, e la determinazione della carica virale (HIV RNA), che indica l'entità della replicazione del virus. A questi test si possono aggiungere, come prestazioni utili per la stadiazione o il monitoraggio, il test di resistenza alle terapie antiretrovirali (per istaurare una terapia di prima linea e per avere una documentazione della situazione di partenza in caso di successivi fallimenti virologici), il test di tropismo (per conoscere l'utilizzo corecettoriale del virus, propedeutico per l'impiego della classe degli antagonisti del CCR5), e la quantificazione del DNA provirale (come parametro che valuta l'entità del reservoir virale nelle cellule del sangue periferico). L'uso della maggior parte di questi parametri nella gestione clinica del paziente infetto HIV costituisce, nei paesi industrializzati, lo "standard of care" per il monitoraggio dell'infezione; le linee guida di riferimento nazionali ed internazionali che stabiliscono il corretto uso di questi parametri sono oggetto di continuo aggiornamento.

### **La carica virale (HIV RNA).**

Il genoma virale (RNA) dell'HIV diventa misurabile nel plasma circa 7-10 giorni dopo il contagio e raggiunge in pochi giorni una concentrazione estremamente elevata. Successivamente, in corrispondenza dell'attivazione della risposta immune, i livelli di HIV RNA decrescono fino a stabilizzarsi, dopo un periodo variabile da soggetto a soggetto (generalmente entro 6-9 mesi dall'infezione), intorno ad un *plateau*. I livelli plasmatici di RNA virale così stabilizzati costituiscono il *set-point* virologico del paziente, restano relativamente costanti per lungo tempo; successivamente, se il paziente non viene sottoposto a terapia antiretrovirale, la viremia aumenta gradualmente, finché, negli stadi avanzati della malattia, raggiunge di nuovo valori estremamente elevati.

Con l'introduzione della terapia antiretrovirale, la misura della carica virale rappresenta il parametro standard per misurare l'efficacia delle terapie, in parallelo con la determinazione del numero dei linfociti CD4. Il trattamento efficace con le attuali combinazioni di farmaci antivirali consente di ottenere una sensibile diminuzione della concentrazione dell'RNA virale già dopo una-due settimane dall'inizio del trattamento, fino a raggiungere una soppressione che può persistere per lunghi periodi di tempo. Le linee guida internazionali suggeriscono il valore di 50 copie/ml di HIV RNA come la soglia al di sotto della quale si considera raggiunto il "successo terapeutico": l'ottenimento di viremia stabilmente non rilevabile e cioè inferiore a 50 copie/ml rappresenta l'obiettivo delle terapie antiretrovirali. Nel caso in cui non si raggiunga tale soglia entro i primi 6 mesi di terapia, o nel caso in cui alla diminuzione iniziale della carica virale segua un incremento (fallimento virologico), la perdita dell'efficacia degli antivirali è associata di solito alla comparsa di ceppi di HIV resistenti ai farmaci.

Per quanto sia disponibile da diversi anni uno standard internazionale per l'espressione della viremia di HIV-1 in unità internazionali, tale misura viene ancora largamente espressa in copie/ml. Ad oggi sono disponibili almeno 4 metodi commerciali per la determinazione della viremia di HIV-1 che impiegano amplificazione in Real-Time PCR, con sensibilità analitiche di 20-40 copie/ml.

I risultati che si ottengono dall'applicazione di queste metodiche risultano sostanzialmente equivalenti in termini di sensibilità e riproducibilità. In particolare, i problemi legati alla variabilità genetica associata con i diversi sottotipi di HIV-1 sono stati in gran parte superati, anche se permangono segnalazioni di differenze di quantificazione del RNA virale di forme ricombinanti, come ad esempio il CRF02\_AG (uno dei sottotipi non-B ad oggi più diffuso in Italia). Va sottolineato comunque che la concordanza tra i risultati ottenuti con i sistemi attuali si riduce sensibilmente a valori bassi di viremia

(<200 copie/mL), per cui vi è la raccomandazione di utilizzare lo stesso metodo di misura per il monitoraggio virologico dei singoli pazienti.

Grazie ai regimi terapeutici attualmente disponibili per il controllo della replicazione di HIV-1, attualmente la maggior parte dei pazienti trattati (circa l'85%) risulta virologicamente soppressa. Tuttavia, è noto che, anche quando la viremia è ridotta al di sotto del limite di sensibilità dei saggi diagnostici commerciali, quantità minimali di virus possono persistere nel plasma (viremia residua, VR). La VR non può essere esattamente quantificata con i saggi commerciali attualmente in uso, se non attraverso opportune modifiche dei protocolli di lavorazione o con saggi messi a punto *home-made*. Tuttavia, quasi tutti i saggi fino ad oggi descritti per il dosaggio della VR soffrono della mancanza di standardizzazione e presentano difficoltà di paragone e riproducibilità dei risultati inter- ed intra-saggio. Sono in corso diversi studi finalizzati atti ad indagarne il significato clinico della VR nei soggetti trattati. Recenti studi indicano che la quantificazione della carica virale al di sotto della soglia del successo terapeutico potrebbe rivelarsi utile come marcatore prognostico di un futuro fallimento terapeutico o di una viremia persistente a basso numero di copie, e costituire un termine di paragone di efficacia tra i diversi regimi terapeutici disponibili.

Studi recenti hanno messo in evidenza una nuova unità di misura, definita come “copie di HIV-RNA prodotte per anno” (“viremia copy years”, VCY), che corrisponde all'area sotto la curva dei valori longitudinali di viremia, ottenuti da misurazioni in un singolo paziente durante un anno di osservazione e rappresenta la carica virale globale (o massa virale) circolante nell'organismo in quell'arco di tempo. Evidenze sperimentali indicano che tanto maggiore risulta questo valore, tanto maggiore è il rischio di progressione di malattia e morte, in pazienti in trattamento, ma anche in soggetti naive e con situazione immunitaria non ancora compromessa e cioè che presentano conte di linfociti T CD4 >350/mm<sup>3</sup>. Tale dato avvalorava l'ipotesi che la produzione di particelle virali rappresenti un elemento trainante nella progressione della malattia, nei soggetti prima dell'inizio del trattamento, e anche in coloro già in trattamento antiretrovirale.

Pochi metodi commerciali sono invece disponibili per la quantificazione dell'RNA di HIV-2, le cui performance sono, tuttavia, ancora subottimali e non standardizzate. E' stato recentemente allestito uno standard internazionale per HIV-2, che certamente faciliterà il processo di standardizzazione dei test di misura della carica virale per HIV-2.

### **La carica provirale (HIV DNA).**

La quantificazione dell' HIV DNA provirale nei linfomonociti periferici trova applicazione come parametro indicatore dell'entità del *reservoir* virale, in quanto riflette il numero di cellule circolanti infettate dal virus, gran parte delle quali si trovano generalmente in uno stato di quiescenza che non determina la produzione di progenie virale, ma che può dar luogo a produzione di nuove particelle virali infettanti non appena ci sia uno stimolo che porta all'attivazione di tali cellule.

Poiché attualmente, come si è detto in precedenza, gran parte dei pazienti infetti, grazie all'uso delle terapie antiretrovirali, si trova in soppressione virologica, la misurazione della carica HIV DNA rappresenta uno strumento per monitorare l'andamento delle terapie, anche nei pazienti virologicamente soppressi, poiché fornisce informazioni sulla capacità del regime terapeutico adottato di ridurre i *reservoir* cellulari dell'infezione. Alcuni studi indicano che i livelli basali di HIV-DNA in pazienti *naive* che iniziavano la terapia antiretrovirale sono associati al raggiungimento di livelli non rilevabili sia di HIV-RNA (viremia plasmatica) che di HIV-DNA in corso di terapia. E' stata riscontrata una correlazione positiva tra i livelli di HIV-DNA e rischio di fallimento virologico in pazienti che adottano schemi di semplificazione della terapia antiretrovirale. Infine, alcuni studi hanno evidenziato una correlazione tra la quantità di HIV-DNA provirale e la viremia residua in pazienti trattati con terapia cART e in successo terapeutico.

Oltre che nel monitoraggio delle terapie antiretrovirali, numerosi studi identificano la carica di HIV-DNA nelle cellule mononucleate del sangue periferico come importante marcatore prognostico dell'infezione, specialmente nelle fasi iniziali in cui non si è ancora instaurato il *set-point* virologico dell'HIV RNA.



Tuttavia, le evidenze fino ad oggi disponibili sull'utilità del test di determinazione della carica provirale non sono ancora sufficienti affinché tale test sia considerato essenziale nella pratica clinica corrente. Pesa sulla sua mancata introduzione nella routine diagnostica il fatto che i sistemi per la quantificazione dell'HIV-DNA non sono attualmente disponibili in formulazioni commerciali e sono eseguiti con protocolli di laboratorio, confinati per ora a centri di ricerca. Alcune di questi metodi consentono di distinguere tra forme provirali integrate e forme non integrate, ma generalmente il parametro più utilizzato è la misura del DNA provirale totale. Tali metodiche *in house*, si basano su Real-time PCR che hanno come target l'amplificazione di regioni conservate del gene *gag* o *LTR* del genoma virale. Si ricorda che sono invece disponibili test commerciali per la rilevazione qualitativa dell'HIV DNA o degli acidi nucleici totali di HIV, che possono essere d'ausilio nella diagnosi di infezione HIV in condizioni particolari, quali l'infezione acuta e il neonato da madre sieropositiva, ma non sono di ausilio nel monitoraggio dell'infezione.

### **I test di resistenza agli antivirali**

Il mantenimento prolungato della soppressione virologica rappresenta l'obiettivo principale della terapia, per arrestare il più possibile la progressione della malattia. Lo sviluppo e l'accumulo di mutazione nei geni target dei farmaci inclusi in un determinato regime terapeutico determinano la comparsa di resistenza e sono la principale causa di fallimento delle terapie antiretrovirali. In questo ambito il test di resistenza agli antiretrovirali è uno strumento diagnostico indispensabile.

La valutazione della sensibilità ai farmaci antiretrovirali è raccomandata sia per impostare la terapia antivirale di prima linea, sia per ottimizzarne la scelta farmacologica in caso di fallimento terapeutico. In Europa la trasmissione di ceppi resistenti ad uno o più farmaci riguarda circa il 10% delle nuove infezioni, ma si sta registrando una tendenza alla riduzione, anche se questa tendenza potrebbe non riguardare tutte le classi di antiretrovirali. Diversi studi documentano che gli individui che si infettano con ceppi resistenti sono soggetti ad un rischio maggiore di fallimento virologico ed ad una progressione più veloce della malattia.

I test di resistenza agli antivirali sono di tipo fenotipico (valutazione della concentrazione di un determinato farmaco capace di inibire la replicazione virale *in vitro*) o di tipo genotipico (ricerca di mutazioni basata su analisi di sequenza). I test genotipici sono di gran lunga i più utilizzati nella pratica di laboratorio, mentre i test fenotipici restano utili per approfondire o chiarire quadri di resistenza complessi e sono principalmente utilizzati in ambito di ricerca. Entrambi sono generalmente effettuati sul virus presente nel plasma, in quanto tale popolazione virale rappresenta le varianti in fase di attiva replicazione al momento del prelievo. Per i test genotipici, quando il numero di particelle virali nel plasma è troppo basso per eseguire l'analisi, la ricerca di mutazioni che conferiscono farmaco-resistenze può essere eseguita a livello di DNA provirale.

I test genotipici sfruttano la tecnica del sequenziamento genetico per identificare le mutazioni associate a farmaco-resistenza. Le regioni del genoma virale analizzate nei test genotipici sono quelle del gene *pol*, che codifica per gli enzimi proteasi (PR), trascrittasi inversa (RT) e integrasi (INT), che rappresentano i principali bersagli dei farmaci antiretrovirali, e del gene *env* (gp41), che alberga le mutazioni responsabili della resistenza agli inibitori della fusione. La metodica prevede l'estrazione di HIV-RNA dal plasma o di DNA dai PBMC dei pazienti, l'amplificazione dei geni RT, PR, INT mediante RT-PCR o PCR (rispettivamente) e quindi il sequenziamento dei prodotti di amplificazione. Attualmente sono disponibili due sistemi commerciali per l'analisi genotipica (ViroSEQ HIV-1 Genotyping System e TRUGENE HIV-1 Genotyping, quest'ultimo prossimo alla dismissione) e vari saggi sviluppati da laboratori specializzati, non disponibili in forma di kit. Le sequenze ottenute sono analizzate mediante confronto con una sequenza di riferimento di HIV-1, per evidenziare la presenza di mutazioni. Esistono diversi algoritmi interpretativi di tali test, basati sull'associazione delle mutazioni riscontrate con la resistenza ai singoli farmaci o alle classi di farmaci, che forniscono un "fenotipo virtuale", che indica le probabilità di un determinato virus di essere suscettibile ad un determinato farmaco. Alcuni algoritmi sono disponibili in forma di *software* gratuiti o a pagamento, ma molti laboratori specializzati hanno sviluppato degli algoritmi interpretativi propri.

I test per la valutazione della farmacoresistenza richiedono una elevata specializzazione dei laboratori che li eseguono e una guida esperta nell'interpretazione dei risultati. Le sequenze genetiche virali che possono presentare profili di mutazione complessi e/o cross-resistenze indotte da singole mutazioni non solo devono essere correttamente interpretate tramite algoritmi di interpretazione virologica, ma devono necessariamente essere valutate in un contesto di parametri aggiuntivi, quali eventuali test di resistenza precedenti, dati virologici, immunologici e terapeutici, livelli di aderenza alla terapia e farmacocinetica, per una corretta interpretazione clinica.

### **I test di tropismo**

Come è noto l'HIV è in grado di infettare la cellula ospite mediante l'interazione della glicoproteina dell'*envelope* virale (gp120) con le molecole di CD4 esposte sulla membrana delle cellule bersaglio. L'interazione con il CD4 da sola non è però sufficiente ad avviare l'ingresso del virus nella cellula ospite. E' necessaria infatti una seconda interazione tra una piccola porzione della gp120 (*V3 loop*) e alcune molecole di membrana che fungono da corecettore. Tali molecole sono i recettori delle chemochine, principalmente CXCR4 (usato dai ceppi virali con tropismo per i linfociti T) e CCR5 (usato principalmente dai ceppi con tropismo per i monociti/macrofagi). Il legame preferenziale del virus a uno o all'altro di questi recettori permette di classificare i ceppi di HIV in base al loro utilizzo corecettoriale (od in senso più generico di tropismo) in R5 (*CCR5-using*) e X4 (*CXCR4-using*).

Nei pazienti *naive* alla terapia antiretrovirale e nelle infezioni recenti prevale in genere la presenza di virus R5, mentre nei pazienti con infezione avanzata o pesantemente trattati con terapia antiretrovirale la prevalenza dei virus R5 tende a ridursi a favore di popolazioni miste (dual-tropiche, R5X4), o francamente X4.

Da quando è stata introdotta nella pratica clinica l'uso di una nuova classe di farmaci antiretrovirali antagonisti del CCR5 (es. Maraviroc), che inibiscono la replicazione dei ceppi R5 attraverso il blocco dell'ingresso mediato dal corecettore CCR5, il test per la determinazione del tropismo è entrato a far parte degli esami di diagnostica molecolare fondamentali per la gestione clinica del paziente HIV-positivo. Tale test è, infatti, raccomandato ogni qualvolta venga preso in considerazione l'uso di un antagonista del corecettore CCR5.

Per la determinazione del tropismo virale possono essere utilizzati test fenotipici o test genotipici.

I test fenotipici si basano sull'amplificazione di sequenze della regione *env* ricavate dall'HIV RNA plasmatico e la costruzione di pseudo-virus o virus ricombinanti infettivi che esprimono tali sequenze attraverso un gene reporter. I ricombinanti sono quindi trasfettati in cellule che, oltre al CD4, esprimono o CCR5 o CXCR4. Al momento esistono vari test fenotipici, commerciali e non-commerciali, per la determinazione del tropismo virale (Trofile, XTrackC/PhenX-R e *Toulouse tropism test*). I test fenotipici sono complessi e costosi e sono eseguiti presso laboratori altamente specializzati, o eseguiti *in service* da ditte specializzate.

I test genotipici per il tropismo si basano sul sequenziamento della regione V3 della glicoproteina dell'*envelope* gp120 del virus. Tale regione è responsabile dell'interazione del virus con il corecettore, e la sua sequenza è diversa a seconda della preferenza per CCR5 o CXCR4. Per predire il tropismo sulla base dei dati di sequenza sono stati sviluppati vari algoritmi interpretativi, basati su applicazioni bioinformatiche, quali *geno-to-pheno* (G2P) ed il *Position-Specific Score Matrix* (PSSM), che forniscono dati numerici in forma di indice o *score*, sulla cui base viene stabilito l'utilizzo corecettoriale. In alcuni casi, quando è necessario determinare il tropismo virale in pazienti con viremia soppressa, si può far ricorso alla determinazione del tropismo utilizzando il DNA provirale albergato nei linfomonociti. Sono disponibili linee guida per l'interpretazione degli *score* derivanti dagli algoritmi di predizione corecettoriale, per sequenze virali di derivazione sia plasmatica (HIV RNA) che provirale (HIV DNA), periodicamente aggiornate. E' da sottolineare che gli algoritmi di predizione corecettoriale sono stati principalmente costruiti con sequenze HIV-1 di sottotipo B. Sono in corso studi per estendere le conoscenze di base per la predizione dell'utilizzo corecettoriale anche agli altri sottotipi virali.

### **L'isolamento virale.**

L'isolamento virale, per la sua particolare complessità, non viene utilizzato di routine per la diagnosi di infezione da HIV, ma viene eseguito in casi particolari utilizzando un Laboratorio di Biosicurezza di Livello 3 (BL3). Tale indagine è utile per scopi di ricerca, per la sperimentazione di nuovi farmaci antiretrovirali, per studiare nuove varianti di HIV e per approfondire lo studio di eventi di trasmissione.

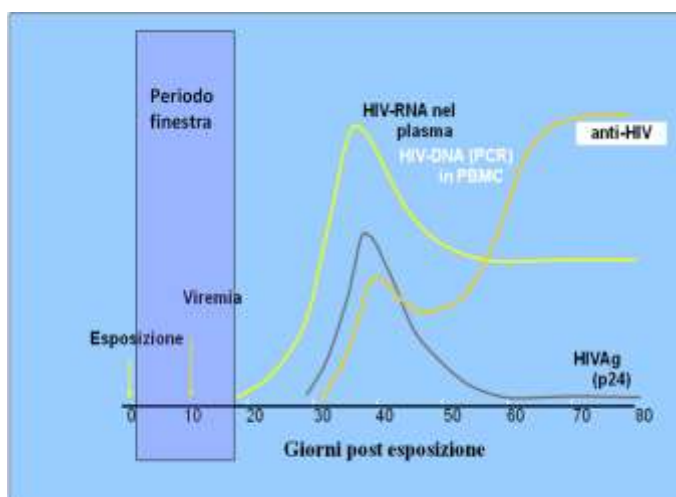
### **Lecture consigliate**

- Bartlett, J. The stages and natural history of HIV infection, 2010. <http://www.uptodate.com/contents/the-stages-and-natural-history-of-hiv-infection>
- Documento di consenso sulle politiche di offerta e le modalità di esecuzione del test per HIV in Italia». (Rep. n.134/CSR). (11A11001) (GU N. 191 DEL 18-8-2011 ).
- Linee Guida Italiane sull'utilizzo dei farmaci antiretrovirali e sulla gestione diagnostico-clinica delle persone con infezione da HIV-1. Centro Nazionale AIDS, Ministero della Salute (Novembre 2013). <http://www.ministerosalute.it/hiv/hiv.jsp>
- The Consortium for Retrovirus Serology Standardization. Serological diagnosis of human immunodeficiency virus infection by Western blot testing. JAMA 1988;260:674–9.
- Gökengin D, Geretti AM, Begovac J, Palfreeman A, Stevanovic M, Tarasenko O, Radcliffe K. European Guideline on HIV testing. Int J STD AIDS. 2014; 25:695-704
- European Guidelines for treatment of HIV-infected adults in Europe by the European AIDS Clinical Society (EACS) [eacsociety.org/Guidelines.aspx](http://eacsociety.org/Guidelines.aspx).
- Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents Developed by the HHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents – A Working Group of the Office of AIDS Research Advisory Council (OARAC). Department of Health and Human Services. <http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>.
- Pandori MW, Branson BM. HIV diagnostics conference. Expert Rev Anti Infect Ther 2010;8:631–3.
- Branson BM. The future of HIV testing. J Acquir Immune Defic Syndr 2010;55 (Suppl. 2):S102–5.
- Miedouge M, Grèze M, Bailly A, Izopet J. Analytical sensitivity of four HIV combined antigen/antibody assays using the p24 WHO standard. J Clin Virol 2011;50:57-60.
- Swenson LC, Cobb B, Geretti AM, Harrigan PR, Poljak M, Seguin-Devaux C, Verhofstede C, Wirlden M, Amendola A, Boni J, Bourlet T, Huder JB, Karasi JC, Zidovec Lepej S, Lunar MM, Mukabayire O, Schuurman R, Tomazic J, Van Laethem K, Vandekerckhove L, Wensing AM; International Viral Load Assay Collaboration. Comparative performances of HIV-1 RNA load assays at low viral load levels: results of an international collaboration. J Clin Microbiol. 2014;52:517-23.
- Chun TW, Murray D, Justement JS, Hallahan CW, Moir S, Kovacs C, Fauci AS. Relationship Between Residual Plasma Viremia And The Size Of HIV Proviral DNA Reservoirs in Infected Individuals Receiving Effective Antiretroviral Therapy. J. Infect. Dis. 2011; 204:135–8.
- Parisi SG, Andreis S, Mengoli C, Scaggiante R, Ferretto R, Manfrin V, Cruciani M, Giobbia M, Boldrin C, Basso M, Andreoni M, Palù G, Sarmati L. Baseline cellular HIV DNA load predicts HIV DNA decline and residual HIV plasma levels during effective antiretroviral therapy. J Clin Microbiol. 2012; 50:258-63.
- Rozera G, Abbate I, Bruxelles A, Bartolini B, D'Offizi G, Nicastrì E, Tommasi C, Capobianchi MR. Comparison of real-time PCR methods for measurement of HIV-1 proviral DNA. J Virol Methods. 2010; 164:135-8.
- Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommendations for a public health approach (June 2013) World Health Organization ([www.who.int/hiv](http://www.who.int/hiv)).
- Vandamme AM, Camacho RJ, Ceccherini-Silberstein F, de Luca A, Palmisano L, Paraskevis D, Paredes R, Poljak M, Schmit JC, Soriano V, Walter H, Sönnnerborg A; European HIV Drug Resistance Guidelines Panel. European HIV Drug Resistance Guidelines Panel. European

recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing: 2011 update. *AIDS Rev* 2011; 13:77-108.

- LPR Vandekerckhove, AMJ Wensing, R Kaiser, F Brun-Vezinet, B Clotet, A De Luca, S Dressler, F Garcia, AM Geretti, T Klimkait, K Korn, B Masquelier, CF Perno, J Schapiro, V Soriano, A Sönnnerborg, AM Vandamme, C Verhofstede, H Walter, M Zazzi, CA Boucher Consensus statement of the European guidelines on clinical management of HIV-1 tropism testing. *J Int AIDS Soc* 2010, 13 (Suppl 4):O7 ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3112869/>
- Svicher V, Alteri C, Montano M, Nori A, D'Arrigo R, Andreoni M, Angarano G, Antinori A, Antonelli G, Alice T, Bagnarelli P, Baldanti F, Bertoli A, Borderi M, Boeri E, Bon I, Bruzzone B, Barresi R, Calderisi S, Callegaro AP, Capobianchi MR, Gargiulo F, Castelli F, Cauda R, Ceccherini-Silberstein F, Clementi M, Chirianni A, Colafigli M, D'Arminio Monforte A, De Luca A, Di Biagio A, Di Nicuolo G, Di Perri G, Di Santo F, Fadda G, Galli M, Gennari W, Ghisetti V, Costantini A, Gori A, Gulminetti R, Leoncini F, Maffongelli G, Maggiolo F, Maserati R, Mazzotta F, Meini G, Micheli V, Monno L, Mussini C, Nozza S, Paolucci S, Palù G, Parisi S, Parruti G, Pignataro AR, Quirino T, Re MC, Rizzardini G, Sanguinetti M, Santangelo R, Scaggiante R, Sterrantino G, Turriziani O, Vatteroni ML, Viscoli C, Vullo V, Zazzi M, Lazzarin A, Perno CF. Genotypic testing on HIV-1 DNA as a tool to assess HIV-1 co-receptor usage in clinical practice: results from the DIVA study group. *Infection*. 2014; 42:61-71.

**Figura 1. Cinetica di comparsa dei principali marcatori di infezione da HIV.**



**Figura 2. Progressiva riduzione del periodo finestra in relazione all'evoluzione dei test sierologici di screening (modificato da Patel et al. Arch Int Med 2010;170:66-74).**

