



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Biologiche

Dottorato di Ricerca in Immunologia

Ciclo XIX

*Dinamica virale e risposta immune HIV-1-specifica in
neonati sottoposti a terapia antiretrovirale ed
immunoricostituzione in bambini infettati da HIV-1 con
differente risposta virologica alla terapia*

Dr.ssa Alessia Anselmi

Tutor: Prof. Vittorio Colizzi

Coordinatore: Prof. Paolo Rossi

*Alla metà del mio cuore che, seppur piccola, appartiene interamente al mio
papà e alla mia mamma,
a mio fratello Andrea e
alla mia più cara amica Carmela.*

*Per ultimo, ma non meno importante,
a Sami, il mio bel Saraceno,
che il cuore me lo ha proprio "rubato".*

Grazie per volermi bene e per far parte della mia vita.

*La ricerca di seguito riportata è stata svolta nel laboratorio della Prof.ssa Anita De Rossi,
presso il Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche, Sezione di Oncologia, Unità di
Oncologia Virologica, Centro di Referenza AIDS dell'Università di Padova, IOV-IRCCS.*

1. SOMMARIO

2. ABBREVIAZIONI

3. INTRODUZIONE

3.1. TRASMISSIONE VERTICALE DELL'INFEZIONE DA HIV

3.2. PATOGENESI

3.3. TERAPIA ANTIRETROVIRALE (ART) NELL'INFEZIONE PEDIATRICA DA HIV-1

3.3.1. SOMMINISTRAZIONE PRECOCE DI ART

3.3.2. IMMUNORICOSTITUZIONE

3.3.3. RISPOSTA DISCORDANTE AD ART

3.4. IMMUNO-ATTIVAZIONE INDOTTA DA HIV-1

4. SCOPO DELLA RICERCA

5. MATERIALI E METODI

5.1. STUDIO EFFETTUATO IN BAMBINI HIV-1-INFETTI TRATTATI PRECOCEMENTE CON HAART

5.1.1. PAZIENTI IN STUDIO

5.1.2. VALUTAZIONE DI HIV-1 RNA NEL PLASMA

5.1.3. VALUTAZIONE DI HIV-1 MRNA NELLE CELLULE

5.1.4. VALUTAZIONE DI HIV-1 DNA

5.1.5. ANALISI DEL FENOTIPO VIRALE

5.1.6. ANALISI GENOTIPICA DI HIV-1

5.1.7. SIEROLOGIA DI HIV-1

5.1.8. PRODUZIONE DI ANTICORPI *IN VITRO* (IVAP)

5.1.9. SAGGIO ELISPOT

5.2. STUDIO EFFETTUATO IN BAMBINI HIV-1-INFETTI CON RISPOSTA DISCORDANTE ALLA TERAPIA

5.2.1. PAZIENTI IN STUDIO

5.2.2. ANALISI CITOFUORIMETRICA DELLE SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE T CD4+ E CD8+

5.2.3. ANALISI DELLA FORMA EPISOMALE DI RIARRANGIAMENTO DEL RECETTORE DELLE CELLULE T (TREC)

5.2.4. ANALISI DEI LIVELLI PLASMATICI DI LIPOPOLISACCARIDE (LPS)

5.2.5. ANALISI STATISTICA

6. RISULTATI

6.1. STUDIO EFFETTUATO IN BAMBINI HIV-1-INFETTI TRATTATI PRECOCEMENTE CON HAART

6.1.1. CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE

6.1.2. VARIAZIONI VIROLOGICHE ED IMMUNOLOGICHE DURANTE HAART

6.1.3. RISPOSTA IMMUNITARIA HIV-1-SPECIFICA

6.1.4. INTERRUZIONE DI HAART (TI)

6.2. STUDIO EFFETTUATO IN BAMBINI HIV-1-INFETTI CON RISPOSTA DISCORDANTE ALLA TERAPIA

6.2.1. CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE

6.2.3. CARATTERISTICHE IMMUNOLOGICHE E VIROLOGICHE DEI BAMBINI HIV-1-INFETTI.

6.2.4. SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE T IN BAMBINI HIV-1-INFETTI E NON INFETTI AL BASELINE

6.2.5. VARIAZIONI DELLE SOTTOPOPOLAZIONI T IN BAMBINI VR E VNR DURANTE HAART

6.2.6. RELAZIONE TRA TREC E CELLULE T CD4+ NEI BAMBINI VR E VNR

6.2.7. LIVELLI PLASMATICI DI LPS NEI BAMBINI HIV-1-INFETTI

7. DISCUSSIONE

8. BIBLIOGRAFIA

9. RINGRAZIAMENTI

10. PUBBLICAZIONI

1. SOMMARIO

Introduzione. L'infezione perinatale da HIV-1 è acquisita quando il sistema immunitario del bambino è in fase di sviluppo ed è caratterizzata da un'elevata e non controllata replicazione virale. La terapia antiretrovirale altamente efficace (highly active antiretroviral therapy, HAART), che genericamente prevede l'utilizzo di inibitori della proteasi e della trascrittasi inversa, riduce efficientemente la carica virale di HIV-1 sotto livelli non rilevabili e aumenta il numero di cellule T CD4+ circolanti nei bambini come negli adulti. Al fine di incrementare le scarse informazioni sul trattamento precoce con HAART e sull'immunoricostruzione in bambini HIV-1-infetti, abbiamo analizzato la dinamica virale e la risposta immunitaria in bambini trattati precocemente con HAART e l'immunoricostruzione in bambini HIV-1-infetti che hanno mostrato una risposta discordante alla terapia.

Metodi. Coorte in HAART precoce: sono stati studiati 6 neonati HIV-1-infetti che hanno iniziato HAART entro i 3 mesi di età. Il valore mediano del follow-up era di 61 mesi. HIV-1 RNA plasmatico, HIV-1 DNA cellula-associato, HIV-1 mRNA unspliced e multiply spliced, anticorpi anti-HIV-1, e le sottopopolazioni cellulari T CD4+ e CD8+ sono stati analizzati in campioni sequenziali di sangue periferico. La risposta immunitaria cellulare HIV-1-specifica è stata misurata mediante saggio EliSpot. Coorte discordate: sono stati studiati al baseline e dopo circa 2 anni di HAART 14 bambini HIV-1-infetti che hanno mostrato una soppressione della viremia plasmatici (rispondenti virologici, VR) e 16 bambini non rispondenti virologici alla terapia (VNR).

Risultati. Coorte in HAART precoce. In tutti i bambini è stata osservata una riduzione della viremia plasmatica che raggiungeva valori non rilevabili. In 4 bambini è stato rilevato l'HIV-1 DNA, di questi 2 erano anche positivi per l'HIV-1 mRNA. In 2 neonati tutti i parametri virali sono rimasti persistentemente negativi. Solo 2 bambini hanno prodotto propri anticorpi anti-HIV-1 mentre gli altri, dopo la perdita degli anticorpi materni, sono rimasti persistentemente sieronegativi. In nessun paziente è stata osservata una risposta immunitaria cellulare HIV-1-specifica. L'interruzione di terapia è stata effettuata in 2 pazienti di cui uno HIV-1-sieropositivo ed uno HIV-1-sieronegativo che aveva tutti i parametri virali persistentemente non rilevabili. L'aumento della viremia plasmatica nel bambino sieronegativo è stato più rapido ed elevato rispetto a quello osservato nel paziente sieropositivo. Coorte discordante. Durante HAART è stato riscontrato un aumento delle

cellule T CD4+ sia nei bambini VR sia nei VNR; tale incremento era più elevato nel primo gruppo rispetto a quello rilevato nel secondo. Tutte le sottopopolazioni cellulari T CD4+ (naive, central memory, effector/memory e CD38+) sono aumentate significativamente nei bambini VR mentre nei VNR l'incremento significativo avveniva solo nelle cellule naive. In entrambe i gruppi si è osservato un aumento nelle cellule T CD8+ e nella forma epitomale di riarrangiamento del recettore delle cellule T (TREC), un indicatore della funzionalità timica. Le cellule T CD8+CD38+ attivate sono diminuite nei bambini VR mentre sono rimaste elevate nei VNR. I livelli plasmatici di lipopolisaccaride (LPS), un indicatore della translocazione microbica, erano aumentati nei pazienti VNR.

Conclusioni. La somministrazione precoce di HAART nel neonato modifica il naturale corso dell'infezione da HIV-1. Tale regime, sebbene controlli la replicazione virale, riduce la viremia plasmatica sotto i livelli soglia necessari ad induce una risposta immunitaria HIV-1-specifica e non previene l'istaurazione di una latenza virale che impedisce l'eradicazione dell'infezione. Un prolungato trattamento con HAART nei bambini HIV-1-infetti permette, inoltre, un aumento delle cellule T naive che è indipendentemente dalla risposta virologica alla terapia. Una viremia persistente, comunque, impedisce l'espansione delle cellule T CD4+ memory suscettibili all'infezione virale e, insieme alla translocazione microbica, contribuisce a mantenere elevati i livelli di immuno-attivazione.

2. ABBREVIAZIONI

3TC	Lamivudina
ART	Terapia antiretrovirale
AZT	Zidovudina
d4T	Stavudina
ddI	Didanosina
HAART	Terapia antiretrovirale altamente efficiente
IDV	Indinavir
IFN-γ	Interferone- γ
LPS	Lipopolisaccaride
NFV	Nelfinavir
NNRTI	Inibitore non nucleosidico della trascrittasi inversa
NRTI	Inibitore nucleosidico della trascrittasi inversa
NVP	Nevirapine
PBMC	Cellule mononucleate del sangue periferico
PCR	Reazione polimerasica a catena
PI	Inibitore della proteasi
RT	Trascrittasi inversa
RTV	Ritonavir
TREC	Forma episomale di riarrangiamento del recettore delle cellule T
VL	Carica virale
VNR	non rispondenti virologici
VR	rispondenti virologici

3. INTRODUZIONE

3.1. TRASMISSIONE VERTICALE DELL'INFEZIONE DA HIV

Il virus dell'immunodeficienza umana (human immunodeficiency virus, HIV) è l'agente eziologico della sindrome da immunodeficienza acquisita (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) [1].

L'infezione da HIV è pandemica e il numero di donne infettate è andato rapidamente aumentando negli ultimi anni. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e l'UNAIDS (United Nations Programme on HIV/AIDS) attualmente stimano che in tutto il mondo su circa 42 milioni di persone HIV-sieropositive (range 35.9-44.3 milioni), più di 20 milioni sono donne, la maggior parte delle quali risultano in età fertile (www.unaids.org). Negli ultimi 20 anni quasi 10 milioni di bambini (oltre il 75% in Africa) hanno acquisito l'infezione per via verticale, più di 5 milioni sono morti per AIDS, circa 2.3 milioni con età inferiore ai 15 anni vivono attualmente con HIV/AIDS e più di 500,000 hanno contratto l'infezione durante la nascita nel 2006 [2] (www.unaids.org). In Italia sono oltre 6,000 i bambini nati da donne HIV-sieropositive segnalati al Registro italiano per l'infezione da HIV.

La trasmissione per via verticale da madre infetta al figlio è la sorgente principale delle infezioni pediatriche da HIV e può avvenire precocemente in utero (meno del 10%) per passaggio transplacentare del virus o, più frequentemente, durante il parto (60-70%) o con l'allattamento al seno (20-30%) quando il virus materno viene a contatto con la mucosa orofaringea del bambino [3]. La somministrazione di farmaci antiretrovirali (come nevirapina) a breve termine nella madre (durante il parto) e nel neonato (subito dopo la nascita), il parto cesareo e la nutrizione artificiale hanno fatto diminuire notevolmente il tasso di trasmissione verticale nei Paesi Occidentali (dal 20-40% al 2%); tuttavia, nei Paesi in via di sviluppo come l'Africa la trasmissione materno-infantile rimane ancora elevata (25-40%) [2]. Per tali motivi,

nonostante l'introduzione della profilassi e della terapia antiretrovirale, la trasmissione verticale di HIV continua ad essere uno dei maggiori problemi a livello mondiale.

3.2. PATOGENESI

La suscettibilità all'infezione da HIV-1 e la capacità di controllare la progressione della malattia dipendono dalla complessa interazione tra il virus e la risposta immunitaria dell'ospite. Numerose evidenze virologiche ed immunologiche nell'uomo ed in modelli animali suggeriscono che sia necessario il raggiungimento di un "livello soglia" di HIV-1 e/o di cellule infettate al fine di instaurare una infezione sistemica e persistente nell'ospite [4]. Tali livelli sono strettamente legati all'interazione virus-ospite. La capacità dell'individuo di attuare una risposta immunitaria qualitativamente e quantitativamente adeguata, infatti, può prevenire sia l'infezione in soggetti sieronegativi ma esposti al virus [5] sia la progressione clinica ad AIDS in pazienti HIV-1-infetti [6,7]. In contrapposizione, HIV-1 è in grado di effettuare un elevato numero di cicli replicativi all'interno della cellula infettata e possiede una estrema variabilità genetica e fenotipica che gli garantisce una straordinaria flessibilità nel rispondere alle pressioni selettive a cui è sottoposto *in vivo*. Tale fenomeno è responsabile dell'elusione della risposta immunitaria dell'ospite e del rapido emergere di varianti virali farmaco-resistenti [8,9].

Nell'adulto la fase acuta dell'infezione è genericamente caratterizzata da una elevata replicazione virale che conduce ad un rapido aumento della viremia (HIV-1 RNA plasmatico) e di forme virali integrate nel genoma cellulare (HIV-1 DNA provirale) e ad una rapida riduzione del numero dei linfociti T CD4+ sia nel sangue sia a livello della mucosa gastro-intestinale dove si verifica una forte deplezione già dalle prime settimane dell'infezione [10] (Figura 1). Tale decremento non avviene in tutte le sottopopolazione linfocitarie ma è ristretto

a livello delle cellule T CD4+ effettrici [11,12] generate dalla proliferazione dei loro precursori nei tessuti linfoidei secondari e migrate successivamente nei siti effettori extra-linfoidei come la lamina propria e l'epitelio intestinale e genitale [13]. La maggior parte di questa sottopopolazione linfocitaria presente nella mucosa esprime sulla sua superficie cellulare il recettore per le β -chemochine CCR5 che è il principale corecettore utilizzato dal virus durante la fase acuta dell'infezione in quanto il fenotipo di HIV-1 più frequente è R5 [14]. Sebbene le cellule T CD4+ effettrici che esprimono il CCR5 si pensi che costituiscano il 50% di tutte le cellule T CD4+ presenti nell'organismo, solo circa il 15% sono presenti nel sangue e nei linfonodi [15]. Tale differente distribuzione spiegherebbe perché la massiccia deplezione riscontrata nell'epitelio mucosale non sempre si rifletta a livello sistemico. Inoltre, le cellule T CD4+ della memoria centrale (central memory) quiescenti (resting) e vergini (naive), principalmente presenti nel sangue e nei linfonodi, non esprimendo CCR5 risultano meno suscettibili all'infezione virale durante la fase acuta e, avendo un elevato potenziale proliferativo, sono in grado di rigenerare le cellule effettrici in seguito a stimolazione antigenica fornendo, così, al virus nuove cellule suscettibili all'infezione [11]. Lo sviluppo di una risposta immunitaria HIV-1-specifica, ed in particolare quella effettuata dai linfociti T CD8+, gioca un ruolo importante nel controllo dell'elevata replicazione virale durante la fase acuta dell'infezione. Molti studi hanno infatti mostrato che la forte espansione dei linfociti T CD8+ HIV-1-specifici (cellule effettrici con attività citotossica) osservata nelle prime settimane dell'infezione (Figura 2) (1) coincide con il picco della viremia plasmatica, (2) precede la produzione di anticorpi neutralizzanti e (3) correla, infine, con la riduzione della carica virale (viral load, VL) durante la fase acuta [16,17]. Tali osservazioni fanno supporre quindi che la risposta HIV-1-specifica dei linfociti T CD8+ insieme all'istaurazione di una latenza virale all'interno di cellule T CD4+ resting siano responsabili, in questa fase, del declino di 2-3 \log_{10} copie di HIV-1 RNA/ml fino a dei livelli non rilevabili. Il forte

decremento della viremia, sebbene permetta un recupero, anche se parziale dei linfociti T CD4+ nel sangue, non sembra avere lo stesso effetto a livello della mucosa dove il numero di cellule T CD4+ rimane costantemente basso (Figura 1) [10,12].

La fase cronica dell'infezione da HIV-1 è caratterizzata da una progressiva riduzione del numero dei linfociti T CD4+ nel sangue, una costante replicazione virale e una generalizzata attivazione del sistema immunitario (Figura 1). La riduzione dell'attività helper esplicita dalle cellule T CD4+ conduce a delle alterazioni funzionali nei linfociti T CD8+ [18] e ad una progressiva perdita dell'attività citotossica delle cellule HIV-1-specifiche [19]. Queste cellule, infatti, mostrano una ridotta produzione di perforina e una perdita *in vivo* dell'espressione della glicoproteina CD28 sulla loro superficie cellulare mentre mantengono quella del CD27. Tali osservazioni suggeriscono una non corretta maturazione in cellule effettrici [20]. A sostegno di questa ipotesi, è stato osservato che la maggior parte dei linfociti T CD8+ HIV-1-specifici sono composti da cellule che mostrano un fenotipo CCR7-CD45RA- caratteristico di cellule pre-effettrici (pre-terminally differentiated effector), non del tutto differenziate e con una ridotta attività citotossica, dimostrando, pertanto, la presenza di un blocco maturativo [21,22]. Le cellule T CD8+ effettrici CCR7- hanno una ridotta capacità proliferativa, producono interferone γ (interferon- γ , IFN- γ) e acquisiscono capacità citolitiche mature dopo l'espressione di CD45RA [13]. L'attivazione cronica delle cellule T indotta da HIV-1 conduce ad un transiente aumento dell'espressione di CD27 e ad una contemporanea riduzione di CD45RA; questa variazione fenotipica porta ad una riduzione delle sottopopolazioni cellulari T CD4+ e CD8+ naive. Tale perdita è affiancata ad una espansione di cellule T effettrici che hanno modulato negativamente l'espressione di CD27 e CD28 in seguito ad una prolungata stimolazione antigenica [23].

Mediante l'utilizzo di una combinazione di markers fenotipici come CD27, la cui espressione viene regolata negativamente in seguito all'interazione con il suo ligando CD70, e

CD45RA è possibile suddividere i linfociti T CD4+ e CD8+ in differenti sottopopolazioni cellulari che mostrano diverse caratteristiche funzionali e capacità di homing [24,25]. Nei linfociti T CD8+ si possono identificare quattro distinte sottopopolazioni cellulari: CD45RA+CD27+ naive; CD45RA-CD27+ central memory; CD45RA-CD27- pre-terminally differentiated effector (pre-effector) che mostrano un fenotipo intermedio; CD45RA+CD27- effettori citotossici (effector) [13,26]. Sebbene la maturazione dei linfociti T CD8+ durante l'infezione primaria nel topo avvenga mediante il differenziamento da naive ad effector e, successivamente, a memory [27], nell'uomo, invece, durante l'infezione virale cronica tale processo sembra avvenire da naive a memory e per via effector/memory ad effector [20]. Per quanto riguarda i linfociti T CD4+, l'espressione differenziale di CD27 e CD45RA permette di identificare le sottopopolazioni cellulari naive CD45RA+CD27+ e due distinte popolazioni memory: CD45RA-CD27+ central memory (resting), meno responsive che necessitano di una forte co-stimolazione per effettuare una risposta antigenica secondaria; CD45RA-/+CD27- effettori/memoria (effector/memory) più differenziate che mostrano una più elevata secrezione di citochine effettrici e capacità di risposta antigenica rispetto alle cellule CD27+ [28]. Il monitoraggio dell'espressione di CD27, pertanto, permette di discriminare i differenti stadi maturativi di cellule effettrici e sottopopolazioni memory a lungo termine.

Sebbene la patogenesi e i principi generali immunologici e virologici siano simili per tutti i pazienti con infezione da HIV-1, ci sono delle differenze sostanziali che riguardano l'andamento dell'infezione nel neonato, nel bambino e nell'adolescente rispetto a quello che è stato osservato nell'adulto. Il bambino, infatti, non è un adulto in miniatura e, a differenza di quest'ultimo, contrae l'infezione principalmente durante il parto, quando il suo sistema immunitario risulta essere immaturo ed incapace di esplicare appieno le sue funzioni. Questa immaturità, pertanto, potrebbe condurre ad una risposta immunitaria adattativa contro il virus ritardata e molto più bassa rispetto a quella normalmente osservata nell'adulto che

condurrebbe ad una più lenta stabilizzazione della viremia [29]. A sostegno di ciò è stato riscontrato che neonati HIV-1-infetti, trattati con la terapia antiretrovirale (antiretroviral therapy, ART) entro i primi tre mesi di vita, mostravano durante il primo anno di vita una bassa risposta cellulo-mediata contro il virus [30] e l'assenza di una propria risposta anticorpale HIV-1-specifica [31]. Tuttavia, recenti studi effettuati in neonati HIV-1-sieronegativi, nati da madri HIV-1-infette con una bassa viremia, hanno evidenziato la presenza di una risposta cellulo-mediata HIV-1-specifica suggerendo che l'esposizione a bassi livelli di antigeni virali potrebbe essere uno dei fattori coinvolti nella protezione dall'infezione [32] anche nel bambino. Un'altra caratteristica importante presente nel bambino è la capacità che quest'ultimo possiede di rigenerare il suo sistema immunitario grazie all'elevata attività timica. Suddetti fattori, se da un lato favoriscono una immunoricostituzione, dall'altro permettono una forte e costante replicazione virale che conduce ad una più rapida progressione della malattia rispetto all'adulto.

In assenza di ART, un bambino su tre mostra precocemente i sintomi dell'infezione e sviluppa l'AIDS entro il primo mese di vita. Anche se nella maggior parte dei casi l'infezione progredisce più lentamente, sono pochi i bambini che rimangono clinicamente asintomatici per più anni [33]. Sebbene il breve intervallo di tempo che intercorre tra la nascita (momento dell'infezione) e l'insorgenza della malattia nel bambino suggerisca fortemente che vi sia una stretta relazione tra la fase precoce dell'infezione e la rapida/lenta progressione della malattia, le informazioni sulla dinamica della replicazione virale durante i primi anni di vita del neonato sono molto scarse. Alla nascita solo in una piccola percentuale di bambini viene diagnosticata l'infezione. Nella maggior parte dei casi (>95%) i livelli plasmatici di HIV-1 RNA e dell'antigene virale p24 non sono rilevabili. Inoltre, i test di isolamento virale (coculture di cellule del paziente e di linfociti di donatore sano pre-stimolati con fitoemoagglutinina) e di quantificazione di HIV-1 DNA provirale risultano negativi con la

conseguenza che l'infezione viene diagnosticata successivamente. Entro la prima settimana di vita, indipendentemente dalla positività o negatività ai test alla nascita, si osserva un aumento della viremia, una positivizzazione delle coculture cellulari e il rilevamento di HIV-1 DNA [34]. Probabilmente la positività o la negatività ai test diagnostici alla nascita è strettamente legata al momento in cui avviene la trasmissione (in utero o intraparto). Un'altra possibile spiegazione, anche se meno probabile o comunque difficilmente riscontrabile, potrebbe essere una latenza virale o una compartimentazione del virus nei tessuti linfoidei prima della nascita.

La viremia e la valutazione dei linfociti T CD4+ sono genericamente utilizzati come markers predittivi di progressione della malattia sia negli adulti sia nei bambini [35]. Sebbene i dati sul loro valore prognostico siano disponibili in molti studi effettuati nell'adulto, nel bambino, ed in particolare nel neonato, invece, non sono ben definiti i livelli soglia sopra i quali si potrebbe avere una progressione rapida in AIDS e spesso essi forniscono informazioni indipendenti ma complementari sulla progressione [36]. La viremia, infatti, durante il primo anno di vita è molto più elevata nei pazienti pediatrici sia con rapida sia con lenta progressione rispetto all'adulto [29,37]. Nel bambino, in genere, i livelli plasmatici di HIV-1 RNA sono relativamente bassi alla nascita (<10,000 copie/ml), aumentano enormemente durante i primi 2 mesi di vita sino a raggiungere, in alcuni casi, dei valori compresi tra 100,000 e 10,000,000 copie/ml per poi, successivamente, declinare lentamente. Comunque, nei neonati valori molto elevati durante il primo anno di vita (>299,000 copie/ml) sono stati associati ad un alto rischio di progressione della malattia e di morte, specialmente in soggetti che mostrano una percentuale di linfociti T CD4+ <15% [35,37]. Sebbene i dati indichino che alti livelli plasmatici di HIV-1 RNA siano associati alla progressione della malattia, la viremia è un parametro difficilmente interpretabile durante il primo anno di vita del bambino in quanto risulta essere molto elevata e variabile con la conseguenza di essere meno predittiva rispetto a quella osservata in bambini più grandi. Per quanto riguarda la valutazione dei

linfociti T CD4+ risulta essere fortemente dipendente dall'età del bambino. Infatti, nel neonato e nel bambino sano, non infettato da HIV-1, la conta assoluta dei linfociti T circolanti, ed in particolar modo dei linfociti T CD4+, è notevolmente più elevata rispetto a quella rilevata nell'adulto non infetto; tali livelli raggiungono dei valori massimi durante le prime 6 settimane di vita (Figura 3) per poi diminuire gradualmente fino a raggiungere quelli osservati nell'adulto verso i 4-5 anni di età [38]. Pertanto, la valutazione della percentuale dei linfociti T CD4+ risulta essere un marker prognostico migliore nel paziente pediatrico, soprattutto durante il primo anno di vita del bambino, rispetto alla conta assoluta [39].

In base al tipo di replicazione virale sono stati identificati tre differenti modelli di dinamica virale durante i primi mesi di vita del bambino (Figura 4) che sembrano essere associati ad una diversa progressione della malattia [29,35,37]. Il modello A (Figura 4 A) è caratterizzato da un aumento sia di HIV-1 RNA sia di HIV-1 DNA. Tali incrementi risultano essere rapidi durante il primo mese di vita e continuano a crescere nel secondo e terzo mese fino a raggiungere livelli superiori a 1-10 milioni copie di HIV-1 RNA/ml e a 1000 copie di HIV-1 DNA/10⁵ cellule mononucleate del sangue periferico (peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Nei mesi successivi entrambe i valori tendono a rimanere elevati. Contemporaneamente, il numero dei linfociti T CD4+ si riduce rapidamente nei primi mesi, successivamente tende a declinare gradualmente. Il modello B (Figura 4 B) è caratterizzato da un rapido aumento della replicazione virale (HIV-1 RNA plasmatico e HIV-1 DNA provirale) accompagnato da una forte iniziale riduzione del numero dei linfociti T CD4+. L'andamento durante le prime settimane di vita del bambino risulta essere simile a quello osservato nel modello precedente. Successivamente vi è un declino della viremia plasmatica che comunque risulta essere più lieve e lento rispetto a quello osservato nell'adulto alla fine della fase acuta dell'infezione [40,41]. La VL plasmatica, infatti, diminuisce di 0.5-1 log₁₀ copie di HIV-1

RNA/ml nel 2°-4° mese dopo il picco; successivamente la riduzione è di circa 0.2-0.4 log₁₀ copie/ml per anno.

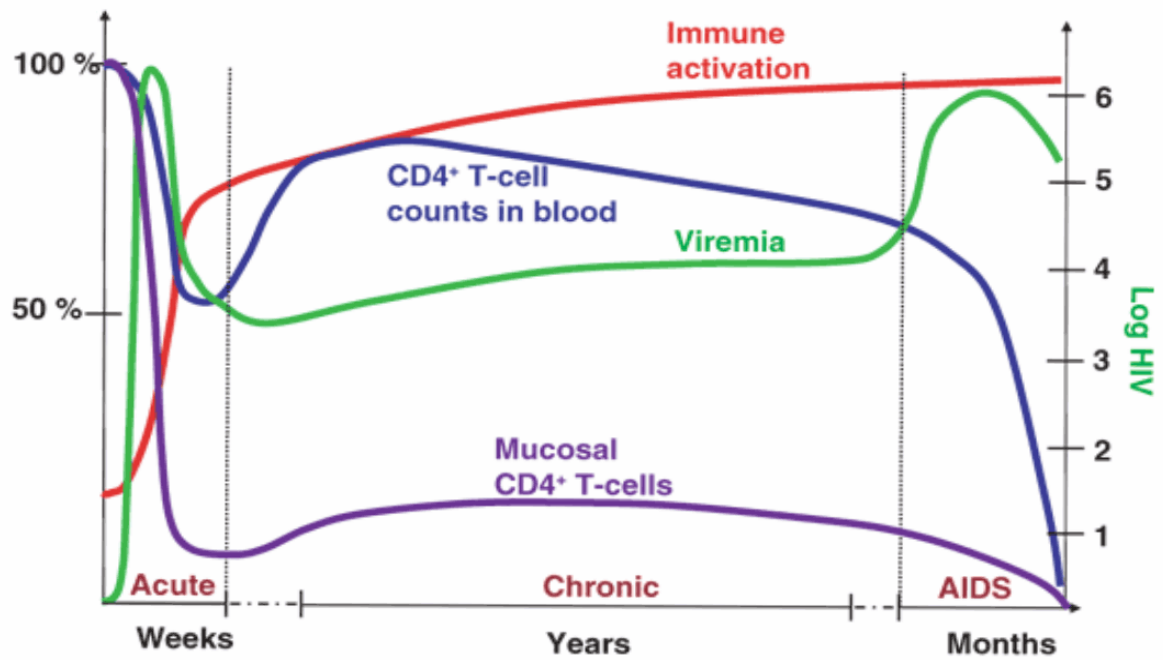


Figura 1. Schema esemplificativo che mette in relazione le variazioni dei linfociti T CD4+ nel sangue e nella mucosa con la viremia e i livelli di immuno-attivazione indotta dal HIV-1 durante la progressione della malattia. *Grossmann Z, et al; Nat Med 2006 [11].*

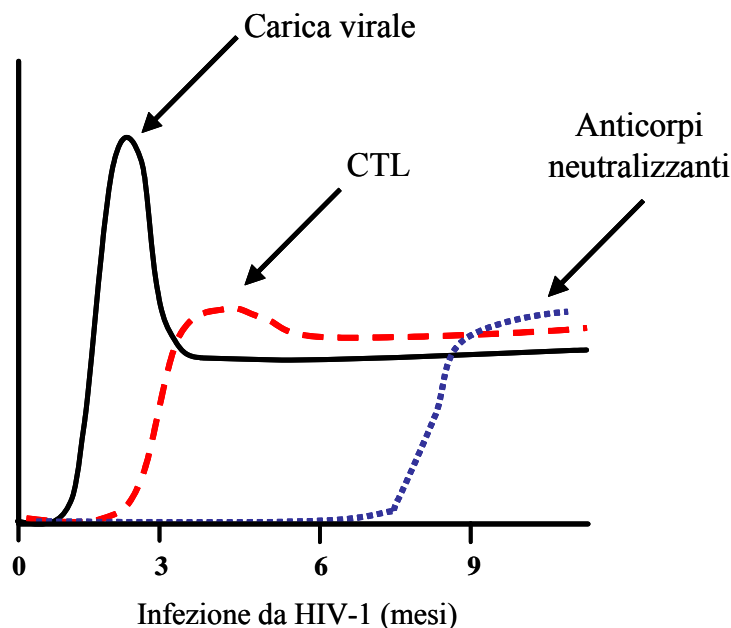


Figura 2. Tipico andamento della viremia plasmatica e della risposta immunitaria HIV-1-specifica durante i primi mesi dell'infezione da HIV-1. Nel grafico sono schematizzati rispettivamente i livelli della carica virale, dei linfociti T CD8+ citotossici (CD8+ cytotoxic T lymphocytes, CTL) e degli anticorpi neutralizzanti. *Gandhi RT and Walker BD; Annu Rev Med 2002 [17].*

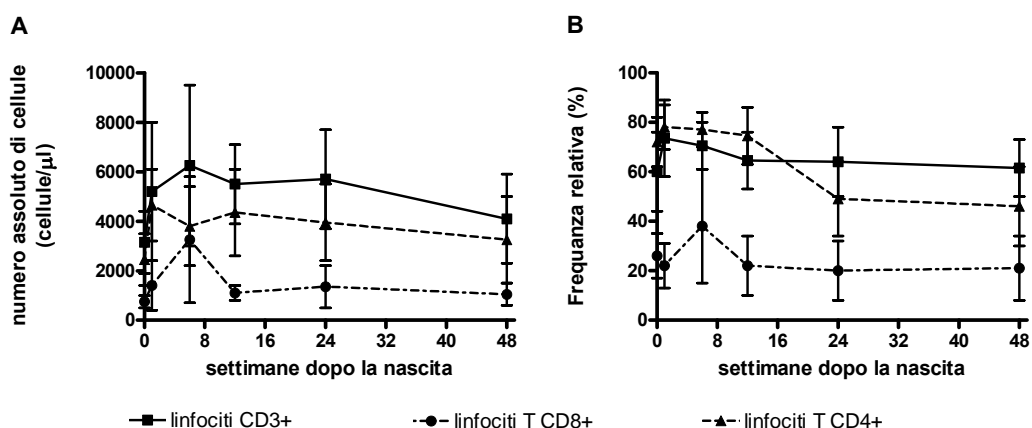


Figura 3. Variazioni dei linfociti T in 11 bambini sani durante il primo anno di vita (48 settimane). I valori medi del numero assoluto e della percentuale (frequenza relativa) dei linfociti T CD3+ e delle sottopopolazioni linfocitarie T CD4+ e CD8+ sono mostrati rispettivamente nel grafico A e B. *De Vries E, et al; Pediatr Res 2000 [38].*

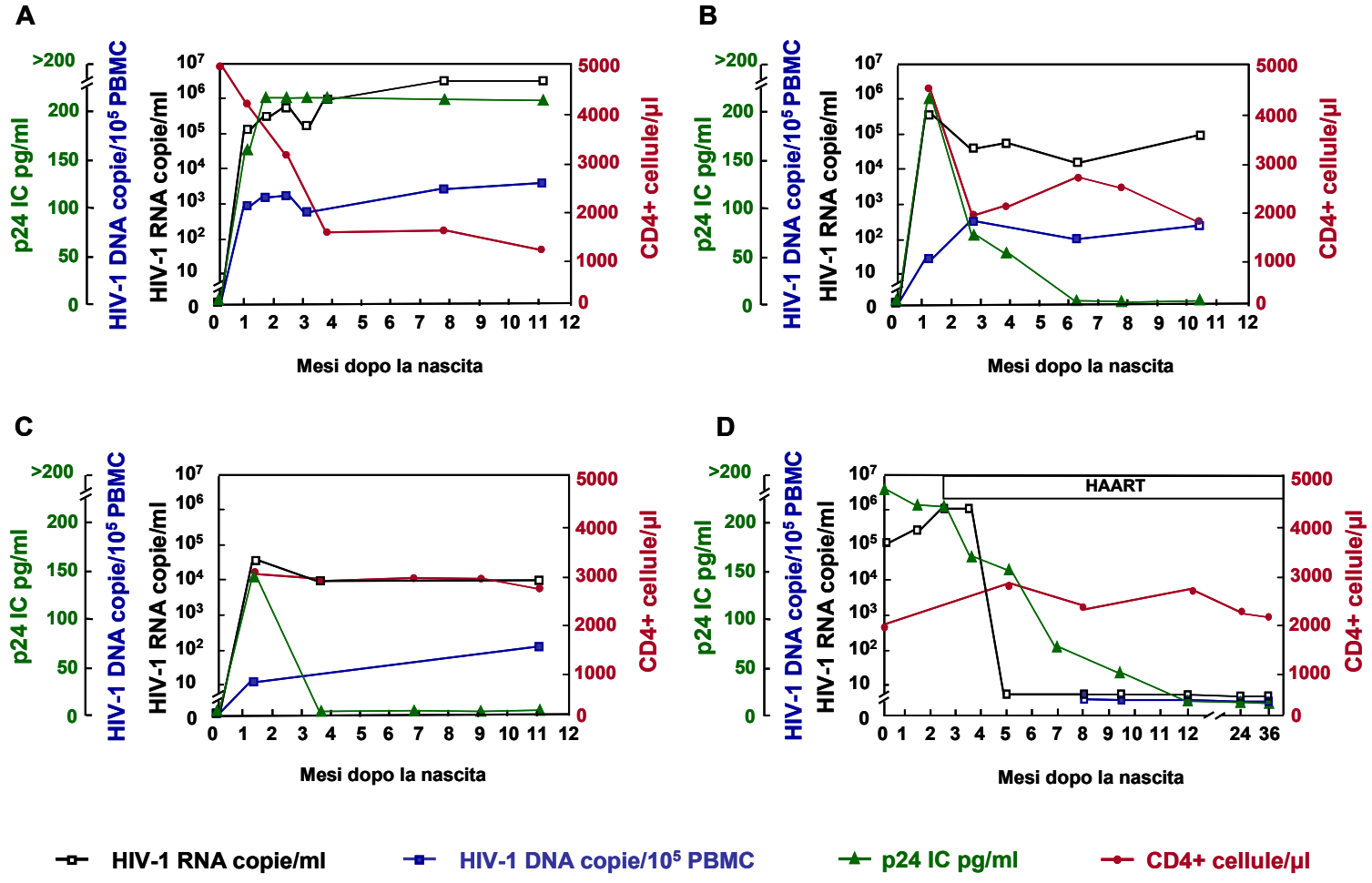


Figura 4. Esempi di profili virologici ed immunologici in neonati HIV-1-infetti non trattati (A, B e C) e trattati con la terapia antiretrovirale altamente efficace (highly active antiretroviral therapy, HAART) (D) durante i primi mesi di vita. HIV-1 RNA plasmatico (□) e HIV-1 DNA (■) sono espressi in scala logaritmica. Sono inoltre riportati i livelli dell'antigene virale p24 (▲) e il numero di cellule T CD4+ (●). De Rossi A, et al; *J Clin Invest* 1996 [29].

3.3. TERAPIA ANTIRETROVIRALE (ART) NELL'INFEZIONE PEDIATRICA DA HIV-1

L'introduzione di ART ed in particolar modo della terapia antiretrovirale altamente efficace (highly active antiretroviral therapy, HAART) dal 1996 ha avuto un notevole impatto sulla storia naturale dell'infezione da HIV-1 sia nell'adulto sia nel bambino. Questo ciclo terapeutico, infatti, è stato associato al crollo della morbilità e mortalità per HIV-1 grazie ad un netto miglioramento immunologico che è strettamente associato ad una riduzione delle infezioni opportunistiche e ad una minor incidenza di tumori HIV-1 associati [42].

Rispetto ad ART, che prevede l'utilizzo di uno o due inibitori della trascrittasi inversa virale (reverse transcriptase, RT), HAART combina farmaci antiretrovirali appartenenti a differenti classi: due inibitori della RT che possono essere nucleosidici (nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI) e non-nucleosidici (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NNRTI), i quali agiscono durante le prime fasi del ciclo virale bloccando la retrotrascrizione dell'RNA; un inibitore della proteasi (protease inhibitor, PI) che blocca le fasi tardive della maturazione virale impedendo alle cellule di produrre virioni infettanti. L'utilizzo di questa combinazione di farmaci, oltre a fornire un effetto sinergico sulla replicazione virale, riduce l'insorgenza di mutazioni che conferiscono resistenza a più farmaci. La politerapia minimizza, inoltre, la tossicità/intolleranza per ciascun farmaco riducendo gli effetti collaterali che, tuttavia, rimangono comunque elevati costituendo un problema quotidiano nella gestione e nell'aderenza della terapia [43].

Pazienti pediatrici cronicamente infettati da HIV-1 sottoposti a tale regime terapeutico presentano, solitamente, una drastica e duratura soppressione della replicazione virale dalle prime 4-8 settimane di trattamento (Figura 4 D). La forte riduzione esponenziale della VL arriva a raggiungere livelli plasmatici di HIV-1 RNA non rilevabili. Tale decremento, inoltre, è accompagnato da un aumento prolungato nel tempo di linfociti T CD4+. Sebbene l'HIV-1

RNA non sia rilevabile nel plasma, l'HIV-1 DNA rimane costantemente presente nelle cellule suggerendo l'istaurazione di una latenza virale in cellule CD4+ memory resting presenti in circolo. In pazienti sottoposti ad ART, che hanno una viremia plasmatica non detectabile per un lungo tempo, sono stati rilevati bassi livelli di trascrizione e replicazione virale. Tali valutazioni sono state effettuate mediante l'analisi di diversi trascritti virali (HIV-1 mRNA intra-cellulari) come RNA "unspliced" (RNA_{us}), che codifica le proteine Gag e Gag-Pol e serve anche come RNA genomico, e RNA "multiply-spliced" (RNA_{ms}) più raramente rilevato che codifica per proteine regolatrici del virus [44,45].

Sebbene ART, ed in particolar modo HAART, abbiano nettamente aumentato la sopravvivenza dei bambini con infezione da HIV-1 e abbiano mostrato un buon controllo della replicazione virale, sempre più mostrano limiti che richiedono la messa a punto di nuove strategie terapeutiche. La terapia, infatti, è incapace di eradicare l'infezione cronica in quanto il virus persiste in forma latente in cellule resting [46,45] ed è difficilmente somministrabile per un lungo periodo a causa dei suoi pesanti effetti collaterali. Restano tuttavia ridotte le opzioni terapeutiche nei bambini in quanto la maggior parte dei farmaci antivirali impegnati nella pratica clinica o nei trial non è disponibile in formulazione pediatrica. I casi di fallimento o di incompleta risposta alla terapia sono sempre più numerosi e sembrano non essere influenzati dai diversi clades virali [48] e spesso non spiegabili con l'insorgenza di varianti virali farmaco-resistenti [49]. Inoltre questi appaiono più numerosi tanto minore è l'età del bambino suggerendo un ruolo importante del dosaggio farmacologico e dell'aderenza alla terapia [50].

3.3.1. SOMMINISTRAZIONE PRECOCE DI ART

Evidenze sperimentali emerse in numerosi studi clinici effettuati in adulti e in bambini hanno suggerito che la replicazione virale giochi un ruolo centrale nella patogenesi

dell'infezione da HIV-1 [8]; pertanto il monitoraggio della dinamica virale durante l'infezione primaria potrebbe avere un significato predittivo sulla progressione della malattia sia nell'adulto che nel bambino [29,51].

Sebbene ART non sia capace di eradicare l'infezione da HIV-1, la sua somministrazione precoce, durante l'infezione primaria, riduce notevolmente la replicazione virale e preserva la funzionalità del sistema immunitario riducendo pertanto la progressione della malattia. Studi effettuati nell'adulto hanno mostrato che: (1) il trattamento precoce con ART permette il rapido recupero nel numero dei linfociti T CD4+ e nel rapporto CD4+/CD8+, la riduzione di HIV-1 RNA plasmatico fino a livelli non rilevabili che è più grande e più rapida rispetto a quella osservata in pazienti non trattati [51]; (2) il declino di HIV-1 DNA provirale è più efficiente quando la somministrazione di ART viene iniziata durante la fase primaria dell'infezione rispetto a quando viene iniziato durante la fase cronica [51,52]. Per quanto riguarda la risposta immunitaria HIV-1-specifica, dati recenti nell'adulto hanno evidenziato che l'uso precoce di ART preserva tale immunità sostenendo la funzione helper dei linfociti T CD4+ HIV-1-specifici ed impedendo alterazioni funzionali a livello dei linfociti T CD8+ HIV-1-specifici [53,54] i quali durante la fase cronica dell'infezione sono costituiti principalmente da cellule effettrici CD45RA-CD27- non del tutto differenziate (pre-effector) che presentano un blocco maturativo nel compartimento effettore [22].

Benché la deplezione dei linfociti T CD4+ e la progressione della malattia avvenga più rapidamente nel bambino rispetto all'adulto, pochissimi studi sono stati effettuati per valutare l'effetto della somministrazione precoce di ART nel neonato HIV-1-infetto. Studi effettuati in macachi rhesus con infezione da SIV (simian immunodeficiency virus) hanno dimostrato che la somministrazione di ART durante la fase acuta riduce la viremia plasmatica, aumenta la risposta immunitaria antivirale e sembra non favorire la comparsa di mutazioni farmaco-resistenti rallentando la progressione della malattia [55]. Questi risultati, insieme a quelli

effettuati nell'adulto, suggeriscono, pertanto, che anche nel neonato la somministrazione precoce di un potente regime terapeutico durante la fase primaria dell'infezione da HIV-1 potrebbe permettere un miglior controllo della replicazione virale potenziando la risposta dei linfociti T CD8+ verso il virus, che è stata vista essere fondamentale per il controllo iniziale della replicazione virale in questa fase [16] e preservare il sistema immunitario. Tale ipotesi è supportata anche da alcuni studi clinici effettuati in neonati infettati da HIV-1 trattati precocemente con ART. In uno studio clinico (Paediatric European Network for Treatment of AIDS 7, PENTA 7) effettuato su 20 neonati trattati con ART entro i primi tre mesi di vita, sebbene abbia dato buoni risultati clinici (bassa tossicità dei farmaci, alta tollerabilità e nessuna rilevante manifestazione clinica) e immunologici per un periodo superiore a 72 settimane dall'inizio della terapia, ha evidenziato un alto tasso di fallimento virologico (70% dei neonati) in quanto la VL plasmatica non diminuiva mai al di sotto di 400 copie di HIV-1 RNA/ml e tendeva ad aumentare alla 72^a settimana. La non completa soppressione della replicazione virale è stata associata nel 30% dei casi alla comparsa di mutazioni farmaco-resistenti [56]; tale percentuale risulta essere molto più elevata rispetto a quella osservata nell'adulto trattato con ART durante la fase primaria dell'infezione [57]. In un'altro studio, invece, la somministrazione di ART entro i tre mesi di vita è stata associata ad un più lungo periodo di soppressione della replicazione virale nel plasma rispetto a quando la terapia veniva iniziata successivamente [58]. Per quanto riguarda la dinamica di HIV-1 intra-cellulare e la risposta immunitaria HIV-1-specifica le informazioni presenti in letteratura sono ancora più scarse. Nei pochi studi condotti in neonati HIV-1-infetti è emerso che la soppressione della replicazione virale per un periodo di 1-2 anni è associata ad una riduzione non solo di HIV-1 RNA plasmatico ma anche di intermedi replicativi extracromosomiali (HIV-1 DNA episomiale). Sebbene la funzionalità del sistema immunitario in questi pazienti appare preservata, la risposta immunitaria HIV-1-specifica non è stata rilevata in molti bambini [31].

L'assenza di tale risposta contrasta con quello che è stato osservato nell'adulto. Questi risultati potrebbero essere giustificati sia dalla immaturità del sistema immunitario sia dalla prolungata soppressione della replicazione virale che porterebbe ad una stimolazione antigenica non sufficiente ad indurre una risposta immunitaria cellulo-mediata.

3.3.2. IMMUNORICOSTITUZIONE

Sebbene la risposta ad ART in termini di soppressione della replicazione virale sia abbastanza simile nell'adulto e nel bambino, molti studi hanno evidenziato notevoli differenze nel meccanismo di immunoricostituzione periferica. A differenza dell'adulto che al momento dell'infezione da HIV-1 possiede un sistema immunitario maturo con la maggior parte delle cellule T CD4+ che presentano un fenotipo CD4+CD45RO+ memory; il bambino acquisisce il virus quando il suo sistema immunitario è immaturo e in fase di sviluppo e il timo produce attivamente nuove cellule T CD4+CD45RA+ naive.

Nell'adulto la ripopolazione periferica (nel sangue) dei linfociti T CD4+ dopo l'inizio della terapia segue un andamento bifasico (Figura 5). Durante la prima fase, l'aumento rapido delle cellule CD4+ avviene a livello del compartimento memory (CD45RO+). La seconda fase, invece, è caratterizzata da un più lento incremento di cellule T CD4+ naive (CD45RA+).

Tale andamento suggerisce che l'immunoricostituzione ad opera dei linfociti T CD4+ memory possa dipendere principalmente da una loro redistribuzione dagli organi linfoidi periferici al circolo sanguigno; infatti, la rapida riduzione della replicazione virale ad opera della terapia può contribuire alla rimessa in circolo di questa sottopopolazione cellulare che prima era reclutata nei tessuti linfoidi [59,60]. L'origine delle cellule che caratterizzano la seconda fase è invece oggetto di discussione. Alcuni studi suggeriscono che la causa più plausibile di tale aumento è principalmente imputabile ad una espansione periferica di cellule T CD4+ naive pre-esistenti rispetto ad una possibile reversione del fenotipo cellulare da

memory CD45RA-/CD45RO+ a naive CD45RA+/CD45RO- [61] o ad una fuoriuscita di nuove cellule T da timo (output timico). La funzionalità timica, infatti, sebbene sia stata riscontrata anche nell'adulto HIV-1-infetto in ART [62], è inversamente correlata con l'età e il suo ruolo nella ripopolazione dei linfociti T CD4+ naive appare quindi comunque secondario.

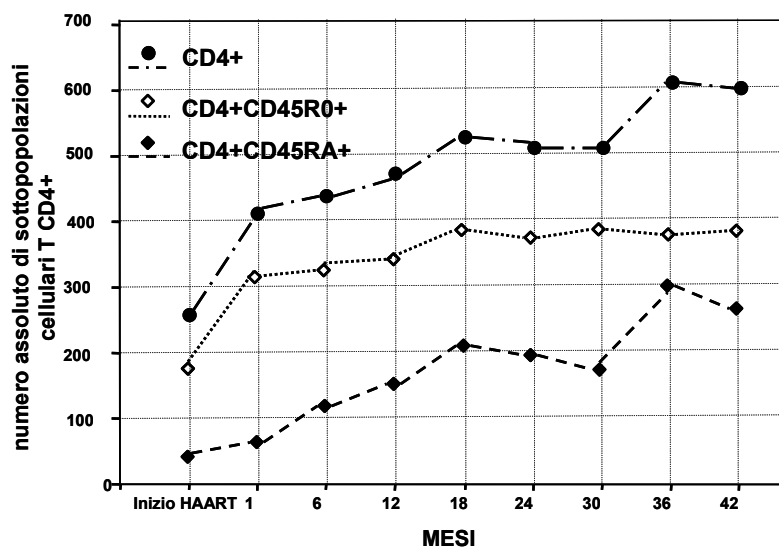


Figura 5. Variazioni delle sottopopolazioni linfocitarie T CD4+ in pazienti adulti HIV-1-infetti sottoposti a HAART. Nel grafico sono riportati i valori medi del numero di cellule T CD4+ e delle sottopopolazioni T CD4+ memory (CD45RO+) e naive (CD45RA+). Choremis-Papadopoulou H, et al; J Med Virol 2004 [60]

A differenza di quanto osservato nell'adulto, nel bambino l'immuno-ripopolazione dei linfociti T CD4+ interessa, fin dai primi mesi di terapia, principalmente il compartimento naive (Figura 6 A). Un piccolo iniziale aumento è stato riscontrato anche nel compartimento memory [63,64]. Poiché nel bambino il timo è particolarmente efficiente, è verosimile che esso giochi un ruolo primario nell'aumento dei linfociti T CD4+ naive. A sostegno di tale ipotesi è stata osservata una forte correlazione tra le dimensioni del timo ed il numero dei linfociti T naive in circolo [65].

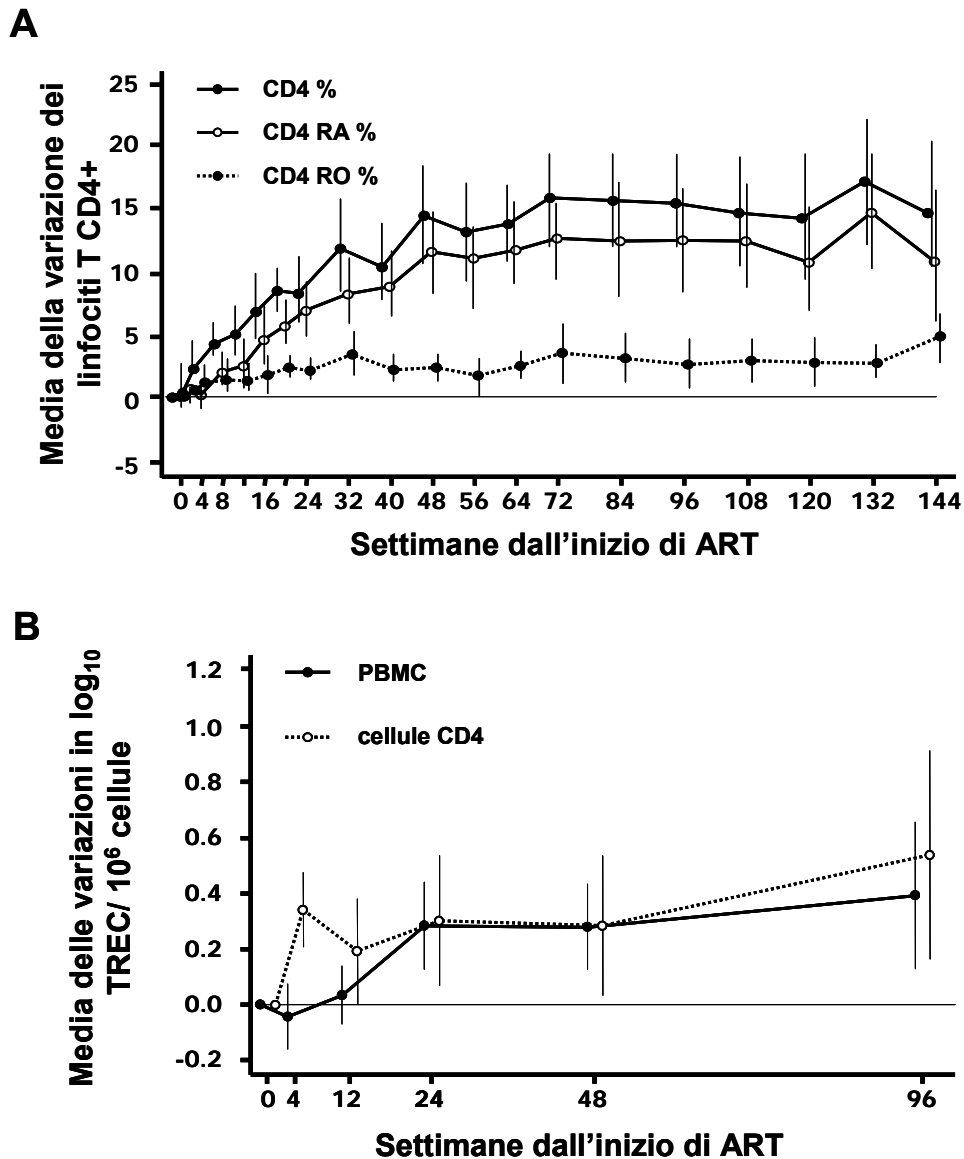


Figura 6. Variazioni delle sottopopolazioni linfocitarie T CD4+ (A) e dei livelli di TREC (B) in bambini HIV-1-infetti durante ART. Nei grafici sono riportati i valori medi delle variazioni. PBMC, cellule mononucleate del sangue periferico. *De Rossi A, et al; J Infect Dis 2002 [64]*

Durante il processo di maturazione intra-timica delle cellule T, i progenitori dei linfociti T vanno incontro a riarrangiamento dei geni codificanti il recettore delle cellule T (T cell receptor, TCR); in questo processo, alcune sequenze cromosomiche sono escisse a formare dei prodotti di DNA episomiali denominati TRECs (TCR rearrangement excision circles)

[66]. I due TREC, prodotti dal riarrangiamento dei due alleli del TCR presenti nella cellula, non replicando durante la mitosi vengono “diluiti” all’interno della popolazione linfocitaria. La loro concentrazione nel plasma è quindi fortemente legata all’output timico. Di conseguenza, la loro quantificazione nel sangue, effettuata mediante una reazione polimerasica a catena (poymerase chain reaction, PCR), permette di misurare l’immissione in circolo di nuove cellule T naive e viene utilizzata in molti studi come un importante marker dell’output timico e dell’immunoricostituzione in pazienti pediatrici HIV-1-infetti sottoposti ad ART [67]. In molti studi è stato osservato un incremento dei livelli di TREC sia nei PBMC che nei linfociti T CD4+ in bambini HIV-1-infetti sottoposti ad ART; tale aumento durante le prime settimane di terapia è maggiore nelle cellule T CD4+ rispetto ai PBMC (Figura 6 B). L’incremento dei livelli di TREC risulta essere più elevato nei bambini che hanno un minor numero di linfociti T CD4+ al momento di inizio della terapia. E’ stata riscontrata, inoltre, una forte correlazione tra l’aumento di TREC e delle cellule T CD4+ naive [64,68]. Tali osservazioni suggeriscono che il recupero della funzione timica è fortemente influenzato dallo stato di deplezione dei linfociti T CD4+ al momento di inizio della terapia. Sebbene vi siano molti studi volti a caratterizzare lo stato di maturazione/differenziamento delle cellule T CD4+ e CD8+ durante ART nell’adulto, le informazioni sulla immunoricostituzione e sulle variazioni delle sottopopolazioni linfocitarie sono particolarmente scarse nel bambino sottoposto ad ART.

3.3.3. RISPOSTA DISCORDANTE AD ART

Sebbene in molti pazienti HIV-1-infetti si osservi una risposta immunologica e virologica positiva ad ART caratterizzata dall'aumento periferico del numero di linfociti T CD4+ e dalla riduzione dei livelli plasmatici di HIV-1 RNA, molti studi hanno descritto pazienti che mostrano una risposta paradossale alla terapia. Se nell’adulto si osserva

principalmente una riduzione della replicazione virale non accompagnata da un aumento delle cellule T CD4+, nel bambino la risposta discordante alla terapia spesso è caratterizzata da un miglioramento immunologico, con aumento del numero dei linfociti T CD4+, che avviene in presenza di persistenti livelli di viremia plasmatica [64,68-72]. Benché i meccanismi di questa risposta nei pazienti pediatrici non siano ben chiari, i sempre più numerosi fallimenti virologici non sembrano essere influenzati dalle diverse clade virali e spesso non sono spiegabili con l'insorgenza di varianti virali farmaco-resistenti [48]. Tale risposta appare più numerosa tanto minore è l'età del bambino suggerendo un ruolo importante nel dosaggio del farmaco antiretrovirale e nell'aderenza [57]. Inoltre, in questi pazienti è stato osservato un elevato output timico non associato alla presenza o meno di varianti virali farmaco-resistenti. Il recupero della funzionalità timica in presenza di replicazione virale potrebbe quindi essere in parte spiegato sia dalla comparsa di varianti virali che hanno una minore capacità replicativa nelle cellule timiche e nei linfociti T CD4+ maturi [73] e sia da variazioni nel tropismo virale come osservato in alcuni casi [70,74]. Tali osservazioni, tuttavia, non chiariscono comunque quali siano i meccanismi che sostengono l'output timico e una eventuale minore deplezione periferica dei linfociti in presenza di varianti virali wild-type. Quale sia, inoltre, l'impatto della persistente replicazione virale sull'immuno-ripopolamento delle sottopopolazioni linfocitarie T CD4+ e sul loro stato di maturazione e di differenziamento rimane da stabilire.

3.4. IMMUNO-ATTIVAZIONE INDOTTA DA HIV-1

L'immuno-attivazione cronica è una delle caratteristiche predominanti della progressione della malattia. L'attivazione policlonale dei linfociti B, infatti, è stata la prima alterazione immunologica osservata nei pazienti HIV-1-infetti [75]. Successivamente sono

state riscontrate altre alterazioni tra cui un'elevata produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie [76], un aumento nel turnover dei linfociti T e nella frequenza delle cellule T con fenotipo memory [77], e, infine, un incremento del numero di linfociti T che presentano sulla loro membrana cellulare alcuni markers di attivazione quali CD38, HLA-DR e CD95 [78].

Sebbene l'immuno-attivazione risulti essere un parametro predittivo della progressione in AIDS molto importante, migliore del monitoraggio della viremia plasmatica [79], le cause che la inducono tuttavia rimangono non del tutto chiare anche se sembra emergere da molti studi l'ipotesi che sia causata, oltre da antigeni di HIV-1, anche da altri antigeni virali e microbici e da citochine e chemochine pro-infiammatorie [76,80]. Recenti studi hanno suggerito che la rapida deplezione delle cellule T CD4+ nella mucosa (Figura 1), causata dalla forte replicazione virale [14], potrebbe essere responsabile delle alterazioni precoci a livello del sistema immunitario locale che condurrebbero a una compromissione dell'integrità della barriera mucosale con conseguente translocazione di microbi e/o prodotti microbici [11,81]. Suddetta translocazione contribuirebbe direttamente all'immuno-attivazione durante la fase cronica dell'infezione da HIV-1 e potrebbe determinare infine la velocità con cui progredisce la malattia [82]. Recentemente è stato dimostrato che i livelli plasmatici di lipopolisaccaride (LPS), maggior componente della parete cellulare di batteri Gram-positivi, potente immunostimolatore [83] ed indicatore della translocazione microbica, sono significativamente aumentati *in vivo* sia in individui con infezione cronica e con AIDS conclamato sia in macachi rhesus cronicamente infettati da SIV. E' stata riscontrata una forte correlazione tra LPS e l'attivazione del sistema immunitario innato ed adattativo; inoltre in pazienti in ART, la riduzione della replicazione virale era accompagnata da un decremento nei livelli di LPS plasmatico e una riduzione dell'attivazione del sistema immunitario. Tali risultati suggeriscono che la soppressione della replicazione virale potrebbe permettere la

ricostituzione del sistema immunitario mucosale prevenendo, pertanto, la translocazione microbica che porterebbe ad una riduzione di LPS nel sangue e, conseguentemente, dell'immuno-attivazione [82].

4. SCOPO DELLA RICERCA

Al fine di incrementare le scarse informazioni sull'efficacia di HAART in pazienti pediatrici HIV-1-infetti, abbiamo valutato:

- 1) la dinamica virale, in particolare il profilo intra- ed extra-cellulare dell'infezione da HIV-1, e la risposta HIV-1-specifica in bambini trattati precocemente (entro i primi 3 mesi di vita) con HAART;
- 2) le caratteristiche dell'immunoricostruzione e lo stato di immuno-attivazione in bambini che hanno mostrato una risposta discordante alla terapia.

5. MATERIALI E METODI

I pazienti pediatrici HIV-1-infetti presenti nelle due distinte coorti prese in esame sono stati seguiti presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova, Italia. L'infezione da HIV-1 nei bambini è stata diagnosticata mediante l'isolamento del virus e tramite una PCR effettuata come descritto in *De Rossi A, et al; J Clin Invest 1996* [29].

5.1. STUDIO EFFETTUATO IN BAMBINI HIV-1-INFETTI TRATTATI PRECOCEMENTE CON HAART

5.1.1. PAZIENTI IN STUDIO. Lo studio è stato effettuato in 6 bambini HIV-1-infetti nati da madri HIV-1-sieropositive che non hanno ricevuto la profilassi antiretrovirale. Il criterio di inclusione è stato l'inizio di HAART entro i primi 3 mesi di vita del neonato. La conta delle cellule T CD4+ e CD8+, i livelli di anticorpi anti-HIV-1 e di HIV-1 RNA plasmatico sono stati monitorati in ogni paziente durante tutto il periodo di studio (follow-up). L'analisi di HIV-1 DNA provirale e di HIV-1 mRNA cellula-associato sono state effettuate in campioni di PBMC crio-preserved isolati dal sangue periferico mediante centrifugazione in gradiente di densità Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

5.1.2. VALUTAZIONE DI HIV-1 RNA NEL PLASMA. I livelli plasmatici di HIV-1 RNA sono stati determinati tramite RT-PCR, reverse transcriptase-PCR (Roche Amplicor Monitor System, New Jersey, USA), come descritto nelle istruzioni. Il limite inferiore di rilevazione è stato di 400 copie di HIV-1 RNA/ml utilizzando il protocollo standard e di 50 copie di HIV-1 RNA/ml con il protocollo ultrasensibile.

5.1.3. VALUTAZIONE DI HIV-1 MRNA NELLE CELLULE. L'RNA totale è stato estratto da $1-5 \times 10^6$ PBMC seguendo la metodica prevista dal Trizol RNA extraction kit (Invitrogen) e risospeso in 30 μ l di H₂O con 0.01% di dietilpirocarbonato (DEPC). Le contaminazioni di DNA sono state eliminate utilizzando Deoxyribonuclease I kit (Invitrogen). 1 μ g di RNA è stato retrotrascritto in cDNA; la reazione è stata effettuata utilizzando Taqman Reverse Transcription assay (PE Applied Biosystems) come riportato nelle istruzioni del kit. I livelli di HIV-1 mRNA-unspliced (HIV-1 RNA_{us}) e di HIV-1 mRNA-multiply-spliced (HIV-1 RNAs), che codificano per *tat/rev*, sono stati determinati mediante una reazione di PCR quantitativa, real-time PCR, come descritto in *Zanchetta M, et al, J Infect Dis 2006* [45]. L'amplificazione è stata effettuata nella piattaforma ABI Prism 7700 thermal cycler (PE Applied Biosystems) utilizzando i primers e le probes (HIVPV22 genome, GenBank accession code K02083) sotto elencati.

Primers	Sequenza
US1 forward	5'-TTAAGTGTTC AATTGTGGCAAAGA-3' (nt 1956-1981)
US2 reverse	5'-AAAAAATTAGCCTGTCTCTCAGTACAATCT-3' (nt 2059-2122)
MS1 forward	5'-AAAGGGAAACCAGAGGAGCTCT-3' (nt 672-693)
MS2 reverse	5'-GCCTGTTCGGGTCCCCTC-3' (nt 8438-8454)
Probes	Sequenza
USP	FAM-5'-CCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATG-3'-TAMRA (nt 2007-2035)
MSP	FAM-5'-TCGACGCAGGACTCGGCTTGC-3'TAMRA (nt 695-715)

Brevemente, la quantificazione dell'RNA presente in ogni campione è stata effettuata mediante l'utilizzo di 2 curve standard ottenute con 5 diluizioni seriali, a concentrazione nota, del plasmide pBH10 per l'RNA_{us}, e di un amplicone per l'RNAs. L'amplicone è stato ottenuto dal cDNA proveniente dalla linea cellulare 8E51 mediante l'utilizzo dei primers MS1

e MS2. Ciascun campione e ogni punto delle due curve è stato corso in duplicato. I valori di HIV-1 RNA di ogni campione sono stati normalizzati con quelli ottenuti dall'amplificazione del gene housekeeping gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) mediante l'utilizzo di GAPDH assay (PE Applied Biosystems). Le copie di HIV-1 RNA sono state espresse per 1×10^6 copie di GAPDH.

5.1.4. VALUTAZIONE DI HIV-1 DNA. Il numero di copie di HIV-1 DNA provirale per 1×10^5 PBMC è stato quantificato mediante real-time PCR come descritto in *Ometto L, et al; AIDS 2002* [69]. Brevemente, i PBMC sono stati lisati in 500 μ l di tampone TE (10 mM Tris-HCL a pH 8 e 0.1 mM EDTA) contenente 0.001% Triton X-100, 0.0001% sodio dodecil solfato e 600 μ g/ml di proteinasi K. La reazione di amplificazione è avvenuta utilizzando i primers forward (5'-TTAAGTGTTTCAATTGTGGCAAAGA-3') e reverse (5'-AAAAAAT TAGCCTGTCTCTCAGTACAATCT-3') e la probe (5'-FAM-CCCCTAGGAAAAAGGGCT GTTGAAATG-TAMRA-3') disegnati per rilevare una regione conservata del gene *gag* di HIV-1. La curva standard è stata ottenuta con 5 diluizioni seriali di DNA estratto dalla linea cellulare 8E51. Il numero di copie di HIV-1 è stato normalizzato con il numero di copie di β -actina ottenuto da una curva standard costruita con il DNA di cellule 8E51.

5.1.5. ANALISI DEL FENOTIPO VIRALE. L'analisi del fenotipo virale è stata effettuata come descritto nel lavoro di *Zanchetta M, et al; Antiviral Therapy 2008* [84]. In breve, l'isolato virale è stato ottenuto da co-culture di PBMC di paziente con PBMC di donatore sano pre-stimolati con fitoemoagglutinina (PHA). Successivamente, le linee cellulari U87MG-CCR5 e U87MG-CXCR4, che esprimono stabilmente il CD4 e il CCD5 o CXCR4, sono state esposte all'isolato virale (equivalenti a 10,000 pg di p24). Dopo 8 giorni dall'infezione, il surnatante è stato testato per l'antigene p24 di HIV-1 utilizzando un kit

commerciale (Vironostika HIV-1 Antigen, Biomérieux); i virus sono stati tipizzati, così, in R5, X4 o R5X4.

5.1.6. ANALISI GENOTIPICA DI HIV-1. L'analisi delle sequenze della proteasi (PR) e della RT del gene *pol* di HIV-1 [84] è stata effettuata sull'HIV-1 DNA ottenuto dal lisato di 1×10^6 PMBC, e sull'HIV-1 RNA estratto da plasma e da PBMC dei pazienti mediante un kit commerciale (Qiagen GmbH, Germany). L'RNA estratto è stato retrotrascritto utilizzando SuperscriptTM III (Invitrogen). Una nested-PCR è stata effettuata utilizzando le coppie di primers sotto elencati (HIVPV22 genome, GenBank accession code K02083).

Primer PR esterni	
PR1-forward	5'-GATAGACAAGGAAGTATCCTTTA3'; nt 2268–2292
PR2-reverse	5'-ATCCATTCCTGGCTTTAATTTTACT-3'; nt 2645–2621
Primer PR interni	
PR3-forward	5'-CTTCCCTCAGATCACTCTTT-3'; nt 2294–2313
PR4-reverse	5'-TGGCTTTAATTTTACTGGTA-3'; nt 2636–2617
Primer RT esterni	
RT1-forward	5'-GGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAA-3'; nt 29–2560
RT2-reverse	5'-TTGACAGTCCAGCTGTCTTTTCTGGCAG-3'; nt 3358–3330
Primer RT interni	
RT6-FW forward	5'-GACAGAAGAAAAAATAAAAGCATT-3'; nt 2672–2695
RT6-RV reverse	5'-TGGAAGCACATTGTACTGATATCT-3'; nt 3044–3021
RT4-FW forward	5'-TTCAGGAAGTATACTGCATTTACC-3'; nt 2964–2987
RT4-RV reverse	5'-TCTTTTCTGGCAGCACTATAGGC-3'; nt 3343–3320

5.1.7. SIEROLOGIA DI HIV-1. Gli anticorpi plasmatici anti-HIV-1 sono stati quantificati utilizzando un kit commerciale ELISA (Enzygnost, Bhering) ed un western blotting (HIV blot 2.2, Alfa Wasserman).

5.1.8. PRODUZIONE DI ANTICORPI *IN VITRO* (IVAP). La produzione spontanea di anticorpi *in vitro* (IVAP) è stata valutata utilizzando un protocollo standardizzato [85]. In breve, i PBMC di pazienti (2×10^6 cellule/ml) sono stati messi in coltura in terreno RPMI con 10% di siero fetale di bovino (FCS), 1% di L-glutamina, 1% di aminoacidi non essenziali e $2 \mu\text{M}$ di 2-mercaptpetanolo in presenza o assenza di pokeweed mitogen (PWM; diluito 1/100). Le immunoglobuline totali (Ig) e gli anticorpi HIV-1-specifici presenti nel surnatante delle colture cellulari sono stati quantificati mediante una analisi radio-immunologica in fase solida.

5.1.9. SAGGIO ELISPO. La risposta HIV-1-specifica dei linfociti T CD8⁺ è stata determinata come descritto in *Propato A, et al; Hum Immunol 2001* [86]. Brevemente, le cellule T CD8⁺ purificate sono state piastrate (5×10^4 cellule/pozzetto) in piastre da 96 pozzetti con fondo in nitrocellulosa (MAHA S4510; Millipore) ricoperte con $5 \mu\text{g/ml}$ di anticorpo monoclonale anti-human IFN- γ (Pharmigen); incubate con 2×10^5 cellule/pozzetto di PBMC autologhi (linfociti T CD8⁺-depleti, irradiati ad 5,000 rads e "caricati" con $10 \mu\text{g/ml}$ di peptidi di HIV-1 HLA-A2-ristretti). Dopo una incubazione di 6 ore a 37°C, le piastre sono state lavate e incubate per 2 ore a temperatura ambiente con $2 \mu\text{g/ml}$ di anticorpo biotinilato anti-human IFN- γ (Pharmigen). Dopo un lavaggio ed una incubazione di 90 minuti a temperatura ambiente con HRP-Streptavidina (diluito 1/500), gli spot sono stati quantificati con AID EliSpot Reader (AID GmbH, Strassberg, Germany). I risultati sono stati riportati come cellule formanti spot (SFC) per 10^6 cellule dopo la sottrazione del background. Le sequenze aminoacidiche dei 16 peptidi HLA-A2-ristretti utilizzati nello studio sono sotto elencate.

Proteina	posizione	sequenza	Proteina	posizione	Sequenza
POL	125	KMIGGIGGFI	POL	156	LVGPTPVNI
ENV	731	LLQLTVWGI	POL	764	MASDFNLPPV
POL	438	KLVGKLNWA	ENV	134	KLTPLCVTL
POL	306	YTAFTIPSI	NEF	158	LTFGWCFKL
GAG	282	MTNNPIPVP	POL	175	CTLNFPISPI
POL	762	RAMASDFNL	POL	869	KAACWWAGI
POL	176	TLNFPISPI	POL	476	ILKEPVHGV
POL	397	VLAEAMSQV	GAG	174	MVHQAISPR

5.2. STUDIO EFFETTUATO IN BAMBINI HIV-1-INFETTI CON RISPOSTA DISCORDANTE ALLA TERAPIA

5.2.1. PAZIENTI IN STUDIO. Lo studio retrospettivo è stato effettuato in 30 bambini HIV-1-infetti, nati da madri HIV-1-sieropositive. Il criterio di inclusione è stato la loro risposta ad HAART che ha permesso la loro suddivisione in 2 gruppi: (1) VR (virological responders, rispondenti virologici) costituito da 14 bambini che mostravano una risposta immunologica positiva alla terapia ed una soppressione prolungata nel tempo della replicazione virale (VL \leq 400 copie di HIV-1 RNA/ml); (2) VNR (virological non-responders, non rispondenti virologici) costituito da 16 pazienti che mostravano una risposta immunologica positiva alla terapia in presenza di una persistente VL (VL >400 copie di HIV-1 RNA/ml). Tutti i bambini al momento dell'inizio della terapia (baseline) erano naive per PI. La conta delle cellule T CD4+ e CD8+ ed i livelli plasmatici di HIV-1 RNA sono stati monitorati in ogni paziente durante tutto il follow-up. E' stato utilizzato come controllo un gruppo composto da 17 bambini non infetti della medesima età dei pazienti arruolati, tutti nati da madri HIV-1-sieropositive. L'analisi immuno-fenotipica, di TREC e di LPS sono state effettuate in campioni di PBMC e di plasmi crio-preserved.

5.2.2. ANALISI CITOFUORIMETRICA DELLE SOTTOPOPOLAZIONI

LINFOCITARIE T CD4+ E CD8+. L'analisi è stata effettuata mediante l'utilizzo degli anticorpi monoclonali anti-CD3 [fluorescein isothiocyanate (FITC)], anti-CD4 [peridinin chlorophyll protein (PerCP)], anti-CD8 (PerCP), anti-CD27 [phycoerythrin (PE)], anti-CD45RA [allophycocyanin (APC)], anti-CD38 (PE) mouse IgG1 (PE) e mouse IgG2b-APC come isotipi di controllo, tutti ottenuti da Becton-Dickinson (BD, Becton- Dickinson Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). L'acquisizione è stata effettuata al citofluorimetro FACSCalibur (BD) utilizzando il software CELLQuest (BD). Sono stati selezionati 50,000 eventi nella regione linfocitaria identificata mediante i parametri morfologici di dimensioni (forward scatter, FSC) e di granulosita (side scatter, SSC). Il numero assoluto delle differenti sottopopolazioni è stato calcolato moltiplicando la percentuale con il numero totale cellule T CD4+ e CD8+. L'espressione differenziale di CD45RA e CD27 è stata utilizzata per identificare le sottopopolazioni cellulari T: CD45RA+CD27+ (naive), CD45RA-CD27+ (central memory), CD4+CD45RA-/+CD27- (effector/memory), CD8+CD45RA-CD27- (pre-effector) e CD8+CD45RA+CD27- (CD8+ effector) [13,28] (Figura 7).

5.2.3. ANALISI DELLA FORMA EPISOMALE DI RIARRANGIAMENTO DEL

RECETTORE DELLE CELLULE T (TREC). L'output timico è stato valutato in 6 bambini VR e 7 VNR mediante la misurazione di TREC in campioni sequenziali dall'ingresso in HAART (baseline) e durante la terapia (1, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 mesi). I Livelli di TREC sono stati analizzati come descritto in *Ometto L, et al; AIDS 2002* [69]. In breve, i lisati dei PBMC (80.000 cellule) sono stati amplificati mediante real-time PCR utilizzando i primers forward (5'-CACATCCCTTTCAA CCATGCT-3') e reverse (5'-GCCAGCTGCAGGGTTTAGG-3') e una probe (FAM-5'-ACACCTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCCCACT-3'-TAMRA). La

quantificazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di un plasmide contenente un frammento di TREC. I valori ottenuti sono stati normalizzati con quelli di β -actina ottenuti da una curva standard di cellule 8E51.

5.2.4. ANALISI DEI LIVELLI PLASMATICI DI LIPOPOLISACCARIDE (LPS).

Ogni campione di plasma è stato diluito 1/5 in H₂O endorossina-free ed incubato a 70°C per 10 minuti per inattivare le proteine plasmatiche. LPS plasmatico è stato quantificato con un kit commerciale (Limulus amoebocyte lysate QCL-1000).

5.2.5. ANALISI STATISTICA. Le differenze tra i diversi parametri analizzati, espressi in valori mediani, sono state analizzate mediante test non-parametrici: il test Mann–Whitney per comparare i dati tra gruppi diversi e il Wilcoxon per comparare i dati all'interno dello stesso gruppo. La regressione lineare è stata effettuata con i valori di TREC e delle cellule CD4+CD45RA+CD27+ ottenuti da campioni sequenziali, la pendenza della retta (slope) di TREC/1 x 10⁵ PBMC per giorno e di CD4+CD45RA+CD27+/ μ l per giorno è stata calcolata in ogni paziente. Le correlazioni tra i differenti parametri sono state effettuate utilizzando il test non-parametrico di Spearman. Le analisi sono state effettuate con il software statistico SPSS version 12.0.

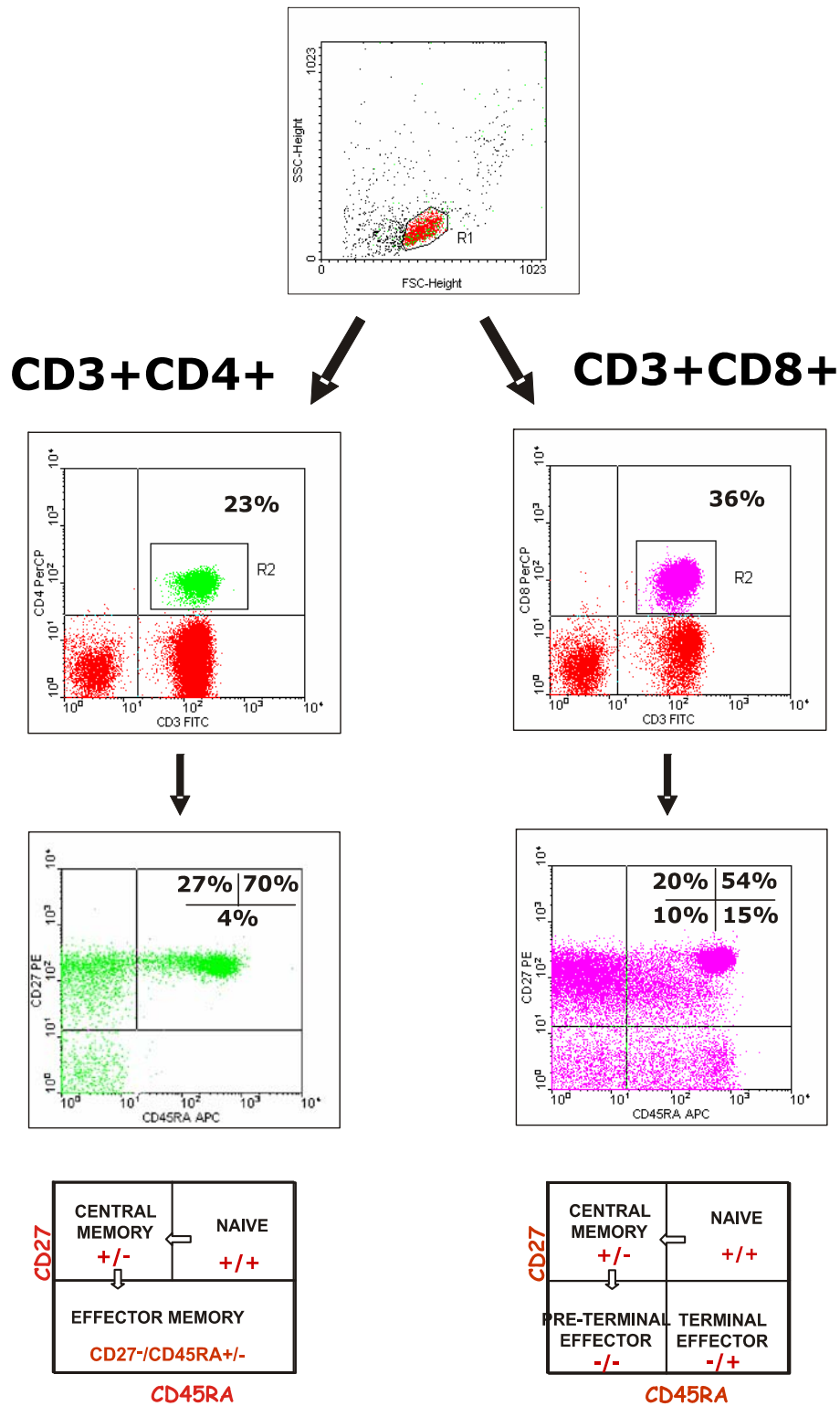


Figura 7. Schema esemplificativo di analisi dello stato di differenziamento/maturazione dei linfociti T CD4+ e CD8+ in un paziente pediatrico HIV-1-infetto. Le sottopopolazioni cellulari sono identificate tramite l'espressione differenziale dei recettori di superficie CD27 e CD45RA mediante tecnica citofluorimetrica.

6. RISULTATI

6.1. STUDIO EFFETTUATO IN BAMBINI HIV-1-INFETTI TRATTATI PRECOCEMENTE CON HAART

6.1.1. CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE. Lo studio è stato effettuato in 6 neonati HIV-1-infetti che hanno iniziato HAART entro 3 mesi di età. Le caratteristiche virologiche ed immunologiche al momento dell'inizio della terapia (baseline) sono mostrate in Tabella 1. L'età mediana di ingresso in HAART è stata di 2.75 mesi (range 2-3 mesi). Al baseline i neonati mostravano dei livelli plasmatici di HIV-1 RNA simili; il valore mediano del numero dei linfociti T CD4+ era di 1,827 cells/ μ l (range 969–2,880); un solo bambino aveva la percentuale delle cellule T CD4+ <25%. In 3 pazienti è stato effettuato l'isolamento virale, l'isolato primario in tutti i casi utilizzava il corecettore CCR5. I neonati erano asintomatici al momento di inizio della tripla terapia che includeva 2 NNRTI in combinazione con un PI o con un NRTI. Il periodo mediano di follow-up è stato di 61 mesi (range 40–87 mesi) (Tabella 2). Dei 6 pazienti, 4 bambini non hanno cambiato la terapia iniziale durante tutto il follow-up, 2 (EA05 ed EA06), invece, hanno interrotto la terapia (TI).

6.1.2. VARIAZIONI VIROLOGICHE ED IMMUNOLOGICHE DURANTE HAART. Dopo l'inizio di HAART, in tutti i bambini l'HIV-1 RNA plasmatico diveniva <400 copie/ml dopo un periodo mediano di 17.5 settimane (range 7-30 settimane) e <50 copie/ml dopo 31 settimane (range 20–40 settimane). Nel periodo successivo la viremia plasmatica rimaneva costantemente non rilevabile ad eccezione di alcuni picchi di replicazione virale (blips) osservati in 4 pazienti che risultavano essere comunque <2,000

copie/ml (Tabella 2). Al fine di comprendere come veniva controllata la replicazione virale sono stati analizzati i livelli di HIV-1 DNA provirale e di HIV-1 mRNA intra-cellulare. L'HIV-1 DNA rimaneva rilevabile durante tutto il periodo di follow-up in 4 bambini (EA1, EA2, EA3 e EA6) su 6 (Figura 8 A); in 3 pazienti, dove è stato misurato sia al baseline e sia dopo un mese di terapia, l'HIV-1 DNA si riduceva fortemente a $0.70 \log_{10}$ copie/ 1×10^5 cellule nel soggetto EA4, a $0.14 \log_{10}$ copie/ 1×10^5 cellule in EA1 ed a $0.06 \log_{10}$ copie/ 1×10^5 cellule in EA06. La persistenza di HIV-1 DNA provirale e la presenza di blips della viremia plasmatica in questi 4 pazienti ha suggerito la persistenza di una replicazione virale residua. Per investigare su tale ipotesi, sono stati analizzati i livelli di HIV-1 mRNA intra-cellulare. L'HIV-1 RNA_{us} e HIV-1 RNA_{ms} crollavano rapidamente dopo l'inizio di HAART, durante il follow-up rimanevano rilevabili solo in 2 bambini (EA01 and EA06), in EA2 si osservava un blip di HIV-1 RNA_{us}. Nei pazienti EA04 e EA05, invece, tutti i parametri di HIV-1 rimanevano persistentemente negativi.

La percentuale dei linfociti T CD4⁺ nel sangue al baseline in tutti i neonati era normale rispetto alla loro età ad eccezione di EA03 in cui era <25%. Durante HAART, in tutti i bambini la percentuale delle cellule T CD4⁺ e la conta dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ rimanevano costantemente all'interno dei valori normali rispetto alla loro età [38,87] (Figura 8 C,B).

6.1.3. RISPOSTA IMMUNITARIA HIV-1-SPECIFICA. In tutti i pazienti, ad eccezione di EA1 e EA6 in cui gli anticorpi HIV-1-specifici persistevano in circolo durante tutto il follow-up rendendo i pazienti sieropositivi, in tutti i pazienti gli anticorpi HIV-1-specifici erano rilevabili per un periodo mediano di 13 mesi (range 12–14 mesi; Tabella 2) dopo del quale si osservava una sieronegatività che rimaneva costante nel tempo (Figura 8 B). La scomparsa di tali anticorpi era simile a quella osservata in bambini non infetti nati da

madri HIV-1-positive [88] indicando una incapacità di produrre propri anticorpi HIV-1-specifici. Suddetta ipotesi è stata confermata in un bambino dal test IVAP in cui è emerso che, sebbene vi era una sintesi *in vitro* di Ig totali in cellule trattate e non con PWM (rispettivamente di 0.201 µg/ml e di 0.513 µg/ml), la produzione di Ig HIV-1-specifiche era inferiore ai livelli di rilevazione [86].

La risposta HIV-1-specifica dei linfociti T CD8+ è stata analizzata in 5 bambini HLA-A2+ dopo un periodo mediano di 37 mesi (range 33–49 mesi) dall'inizio della terapia utilizzando un saggio EliSpot. Come descritto nella Tabella 3, due bambini di cui uno sieronegativo (EA2) ed uno sieropositivo (EA6) non mostravano nessuna risposta HIV-1-specifica verso i 16 peptidi presi in esame; al contrario 2 pazienti sieronegativi (EA03 e EA05) ed uno sieropositivo (EA01) mostravano una bassa risposta contro pochi peptidi.

6.1.4. INTERRUZIONE DI HAART (TI). L'interruzione della terapia antiretrovirale (TI) è stata effettuata in 2 pazienti di cui uno (EA6) aveva valori rilevabili di HIV-1 DNA, HIV-1 mRNA e anticorpi HIV-1-specifici mentre non mostrava alcuna risposta HIV-1-specifica dei linfociti T CD8+; l'altro (EA5) sieronegativo che mostrava una bassa risposta HIV-1-specifica dei linfociti T CD8+ e dei livelli non rilevabili in tutti i parametri virali durante tutto il follow-up (Figura 8 A). Nel paziente EA6, la viremia plasmatica aumentava fino ad un valore massimo di 5.18 log₁₀ copie/ml nella 12^a settimana di TI per poi stabilizzarsi a 4.50 log₁₀ copie/ml durante il rimanente periodo di interruzione. E' stato osservato, inoltre, che l'aumento di HIV-1 RNA plasmatico era preceduto da un incremento di HIV-1 DNA e HIV-1 RNA_{us} (Figura 9 A). Nel bambino EA5 sieronegativo, invece, l'aumento della viremia plasmatica era più rapido e più elevato rispetto a quanto osservato in EA6 e raggiungeva il valore di 5.90 log₁₀ copie/ml nella 4^a settimana di TI. E' da notare che, al contrario di EA6, in EA5 l'aumento di HIV-1 RNA plasmatico precedeva l'incremento di HIV-1 DNA (picco a 87

copie/10⁵ PBMC), HIV-1 RNA_{us} (picco a 1,242 copie/10⁶ copie di GAPDH) e HIV-1 RNA_{ms} (picco a 820 copie/10⁶ copie di GAPDH) nei PBMC. A causa del notevole aumento in tutti i parametri virali, la terapia è stata immediatamente ripresa. L'analisi delle sequenze virali effettuata nei virus isolati dalle cellule e dal plasma ha evidenziato l'assenza di mutazioni farmaco-resistenti durante HAART in tutti i pazienti (dati non mostrati).

Durante il TI, sebbene sia stata osservata una lieve diminuzione nel numero delle cellule T CD4⁺ nel bambino EA5 (da 1,388 a 775 cellule/ μ l) e in EA6 (da 1,708 a 1,071 cellule/ μ l), la percentuale rimaneva >25% in entrambe i pazienti. Non è stata rilevata nessuna variazione del numero e della percentuale nei linfociti T CD8⁺ (dati non mostrati).

La risposta HIV-1-specifica dei linfociti T CD8⁺ è stata effettuata nel paziente EA6 e EA5 prima e dopo il TI, rispettivamente dopo 1 mese e dopo 6 mesi dal ri-inizio della terapia. Come mostrato in Figura 9B, a differenza del bambino EA5 che non mostrava alcuna risposta HIV-1-specifica dei linfociti T CD8⁺, EA6 mostrava una risposta immunitaria cellulare contro diversi peptidi virali.

6.2. STUDIO EFFETTUATO IN BAMBINI HIV-1-INFETTI CON RISPOSTA DISCORDANTE ALLA TERAPIA

6.2.1. CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE. Lo studio retrospettivo è stato effettuato in 30 bambini HIV-1-infetti e in 17 non infetti, tutti nati da madri HIV-1-sieropositive. I pazienti al momento dell'inizio della terapia antiretrovirale (baseline) erano naive per PI. Il regime HAART somministrato prevedeva una tripla combinazione di farmaci che comprendevano due inibitori della RT (zidovudine, lamivudine, stavudine o nevirapine) ed un PI (nelfinavir, indinavir o ritonavir) (Tabella 4). I bambini HIV-1-infetti sono stati

studiati al baseline e dopo circa 2 anni (mediana di 23 mesi; range 19-30 mesi) di HAART; in tutti è stata riscontrata una risposta immunologica positiva alla terapia. In base alla risposta virologica a HAART 14 bambini sono risultati rispondenti virologici (VR) e 16 non rispondenti virologici (VNR). 9 bambini appartenenti al gruppo VNR hanno mostrato una persistente carica virale sebbene avessero effettuato un cambio di terapia.

6.2.3. CARATTERISTICHE IMMUNOLOGICHE E VIROLOGICHE DEI BAMBINI HIV-1-INFETTI.

Le caratteristiche immunologiche e virologiche al baseline e dopo HAART sono descritte nella Tabella 5. Prima di iniziare HAART, i pazienti mostravano un valore medio della viremia plasmatica di $4.5 \log_{10}$ copie di HIV-1 RNA/ml; la percentuale e la conta dei linfociti T CD4+ era significativamente più bassa del gruppo di controllo. In contrapposizione, la percentuale delle cellule T CD8+ era più elevata rispetto a quella osservata nei bambini non infettati.

Al baseline non si osservavano rilevanti differenze nella conta e nella percentuale dei linfociti T CD4+ e CD8+ tra il gruppo VR e VNR. Dopo 2 anni di terapia, vi era un significativo aumento nella percentuale e nel numero delle cellule T CD4+ sia nei bambini VR (13–29%, $P < 0.001$, e 345–686 cellule/ μ l, $P < 0.001$, rispettivamente) sia nei VNR (7–17%, $P = 0.001$, e 210–433 cellule/ μ l, $P = 0.008$, rispettivamente); inoltre, nei linfociti T CD8+ la percentuale decresceva nei bambini VR ($P = 0.003$) mentre il numero assoluto non variava in entrambe i gruppi anche se tendeva ad aumentare nei VNR.

6.2.4. SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE T IN BAMBINI HIV-1-INFETTI E NON INFETTI AL BASELINE.

Al baseline, rispetto al gruppo di controllo, i bambini HIV-1-infetti mostravano una conta cellulare significativamente più bassa in tutte le

sottopopolazione cellulari T CD4+ (naive 157 verso 415 cellule/ μ l, $P < 0.0001$; central memory 85 verso 290 cellule/ μ l, $P < 0.0001$; effector/memory 25 verso 77 cellule/ μ l, $P = 0.0002$ e CD38+ 65 verso 209 cellule/ μ l, $P < 0.0001$) (Figura 10 A) e, al contrario, valori più elevati in tutte le sottopopolazioni T CD8+ (central memory 204 verso 121 cellule/ μ l, $P = 0.038$; pre-effectors 131 verso 34 cellule/ μ l, $P = 0.002$; cytotoxic effector 185 verso 37 cellule/ μ l, $P = 0.001$; e CD38+ 116 verso 25 cellule/ μ l, $P = 0.0001$) eccetto nelle cellule naive che erano significativamente più basse nei pazienti rispetto ai bambini non infetti (191 verso 316 cellule/ μ l, $P = 0.006$) (Figura 10 B).

6.2.5. VARIAZIONI DELLE SOTTOPOPOLAZIONI T IN BAMBINI VR E VNR

DURANTE HAART. Al baseline, sebbene non siano state riscontrate differenze significative nelle sottopopolazioni T CD4+ e CD8+ tra i bambini VR e VNR, la conta cellulare delle cellule T CD8+ pre-effector (CD45RA–CD27–), effector (CD45RA+CD27–) e CD38+ era più variabile nei bambini VNR rispetto ai VR (Figura 11 A,B). Dopo 2 anni di HAART, il numero di cellule T CD4+ aumentava nei 2 gruppi ma in modo differente. Nei bambini VR, l'aumento periferico delle cellule T CD4+ era significativo nelle sottopopolazioni naive (168–462 cellule/ μ l, $P = 0.001$), central memory (97–213 cellule/ μ l, $P = 0.002$) ed effector/memory (32–59 cellule/ μ l, $P = 0.035$) e raggiungeva valori simili a quelli osservati nel gruppo di controllo (Figura 12 A); al contrario, nei VNR l'aumento significativo interessava solo il compartimento delle cellule T CD4+ naive (113–263 cellule/ μ l, $P = 0.015$) mentre le altre sottopopolazioni non variavano rimanendo significativamente più basse rispetto al gruppo di controllo (Figura 12 B). E' stato riscontrato, inoltre, un aumento delle cellule T CD4+CD38+ sia nei bambini VR sia nei VNR (66–142 cellule/ μ l, $P = 0.002$, e 65–124 cells/ml, $P = 0.045$, rispettivamente; Figura 12 A,B). Una correlazione positiva tra il numero delle cellule T CD4+CD38+ e CD4+CD45RA+CD27+ è stata osservata al baseline e

dopo HAART sia nel gruppo VR (al baseline $r_s = 0.84$, $P = 0.0002$; e dopo HAART $r_s = 0.55$, $P = 0.05$) sia nel VNR ($r_s = 0.91$, $P < 0.0001$; e $r_s = 0.80$, $P = 0.0002$, rispettivamente; Figura 13). E' stata osservata anche una correlazione positiva tra l'incremento del numero di cellule T CD4+CD38+ e CD4+CD45RA+CD27+ in entrambe i 2 gruppi di pazienti (VR, $r_s = 0.51$, $P=0.04$; e VNR $r_s = 0.96$, $P < 0.0001$). Sebbene la conta cellulare dei linfociti T CD8+ nei pazienti non variava durante HAART (Tabella 5), è stato riscontrato un aumento significativo nella sottopopolazione T CD8+ naive sia nei bambini VR (da 195 a 358 cellule/ μ l, $P = 0.006$) e sia nei VNR (da 65 a 288 cellule/ μ l, $P=0.004$; Figura 12 C,D). Nessun cambiamento significativo è stato riscontrato nelle altre sottopopolazioni T CD8+ (central memory, pre-effector e cytotoxic effector) nei 2 gruppi sebbene il numero assoluto delle cellule tendeva ad aumentare nel gruppo VNR. Le cellule T CD8+CD38+ diminuivano significativamente solo nei bambini VR (107–60 cellule/ μ l, $P = 0.003$), mentre rimanevano elevate nei VNR.

6.2.6. RELAZIONE TRA TREC E CELLULE T CD4+ NEI BAMBINI VR E

VNR. I livelli di TREC sono stati quantificati durante HAART in campioni sequenziali di 6 bambini VR e 7 VNR. Prima di iniziare la terapia, i livelli di TREC e il numero di cellule T CD4+CD45RA+CD27+ nei bambini VR non differivano significativamente da quelli rilevati nei VNR (Figura 14 A,B). Dopo 2 anni di HAART, i livelli di TREC aumentavano significativamente sia nei bambini VR (1503–5018 TREC/ 1×10^5 PBMC, $P = 0.04$) sia nei VNR (595–2117 TREC/ 1×10^5 PBMC, $P = 0.03$, Figura 14 A). In questo sottogruppo di pazienti HIV-1-infetti, l'aumento delle cellule T CD4+CD45RA+CD27+ riscontrato nei 2 gruppi (Figura 14 B) rifletteva quello rilevato nell'intera popolazione VR e VNR in studio (Figura 12). E' stata riscontrata una correlazione positiva tra i livelli di TREC ed il numero di cellule T CD4+CD45RA+CD27+ nei 2 gruppi prima (VR, $r_s = 0.94$, $P = 0.005$; VNR, $r_s = 0.83$, $P = 0.01$) e dopo HAART (VR, $r_s = 0.88$, $P=0.0019$; VNR, $r_s = 0.81$, $P = 0.015$).

Sebbene l'aumento di TREC nel gruppo VR non differiva significativamente da quello dei VNR, l'incremento nelle cellule T CD4+ naive era più basso nei VNR rispetto ai VR (Figura 14 C,D). L'aumento di TREC, inoltre, correlava positivamente con quello dei linfociti T CD4+ naive nei bambini VR ($r_s = 0.90$, $P = 0.037$), mentre non si osservava nessuna associazione nei VNR ($r_s = 0.48$, $P = 0.33$).

6.2.7. LIVELLI PLASMATICI DI LPS NEI BAMBINI HIV-1-INFETTI. I livelli di LPS al baseline erano significativamente più elevati nei pazienti rispetto al gruppo di controllo ($P = 0.0001$; Figura 15 A), inoltre all'interno dei 2 gruppi in studio non si osservavano sostanziali differenze sebbene nei bambini VNR i livelli plasmatici di LPS tendevano ad essere lievemente più elevati. Dopo 2 anni di HAART (Figura 15 B) i valori di LPS, mentre non variavano nei bambini VR, nei pazienti VNR incrementavano significativamente da 56 a 67 pg/ml ($P = 0.035$).

Tabella 1. Caratteristiche della popolazione in studio al baseline

Pazienti	CD4+ cellule/ μ L (%)	Plasma HIV-1 RNA, log ₁₀ copie/ml	Fenotipo dell'isolato virale	Eta inizio ART, mesei	Terapia antiretrovirale
EA01	2880 (32)	6.0	R5	3	AZT, 3TC, NVP
EA02	1361 (27)	5.3	nd	2	d4T, 3TC, NVP
EA03	969 (16)	4.8	nd	2	AZT, 3TC, NVP
EA04	1950 (32)	6.0	R5	2.5	d4T, ddI, NFV
EA05	1872 (36)	6.0	nd	3	AZT, 3TC, NFV
EA06	1783 (33)	6.0	R5	3	d4T, ddI, NFV

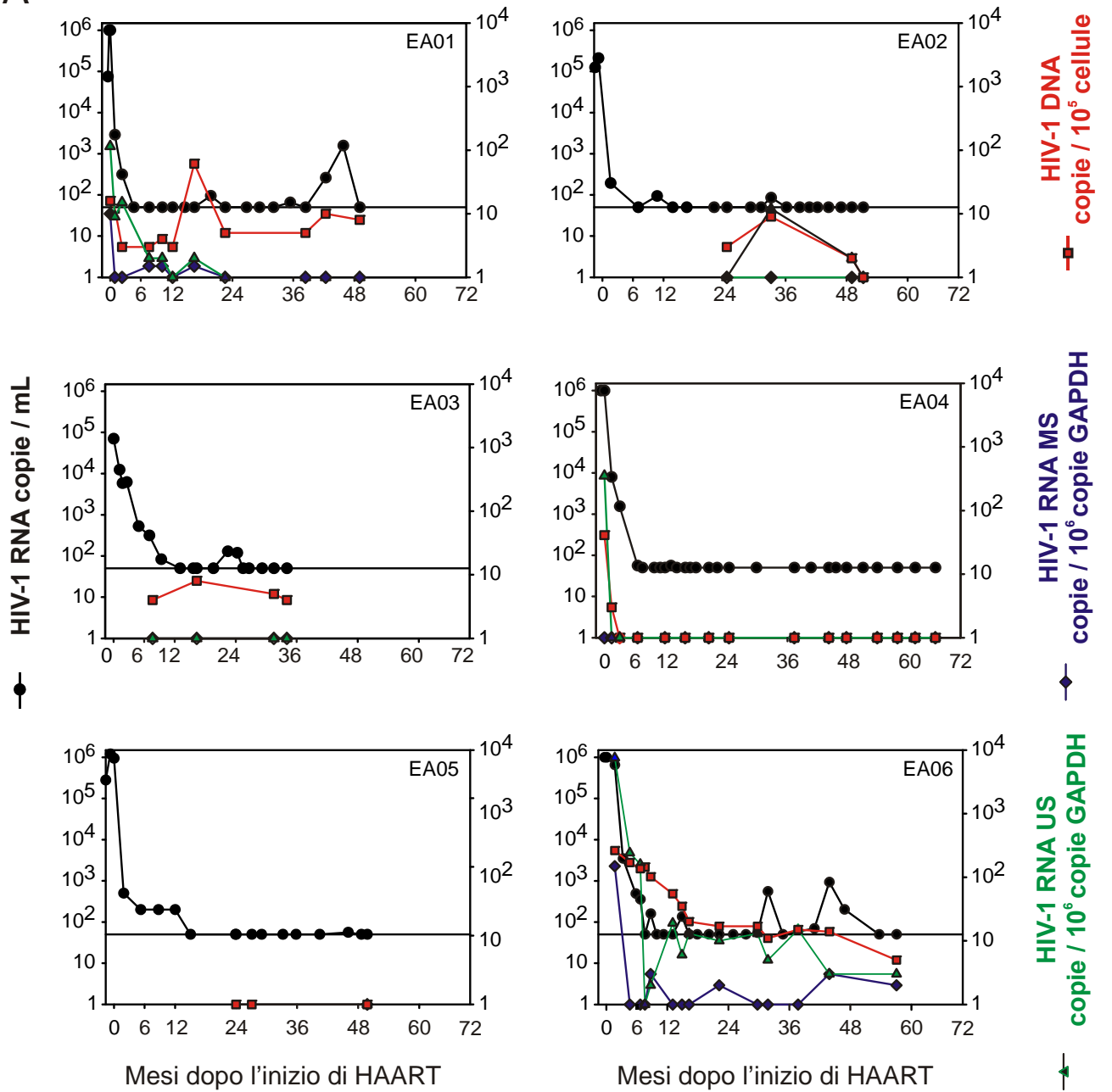
AZT, zidovudina; ddI, didanosina; d4T, stavudina; ND, non determinati; NFV, nelfinavir; NVP, nevirapina; 3TC, lamivudina.

Tabella 2. Follow-up dei bambini in ART

Pazienti	HIV-1 RNA <400 copie/ml, settimane	HIV-1 RNA <50 copie/ml, settimane	Sieroconversione, mesi	Blips di HIV-1 RNA, copie/ml	Periodo di follow-up, mesi	Periodo di follow-up dopo TI, mesi
EA01	10	20	-	95/261/1580	49	-
EA02	7	30	13	94/86	56	-
EA03	30	40	14	130/119	40	-
EA04	28	32	12	-	66	-
EA05	8	22	13	-	87	49
EA06	25	33	-	159/135/557/932	70	56

TI, interruzione di terapia

A



Mesi dopo l'inizio di HAART

Mesi dopo l'inizio di HAART

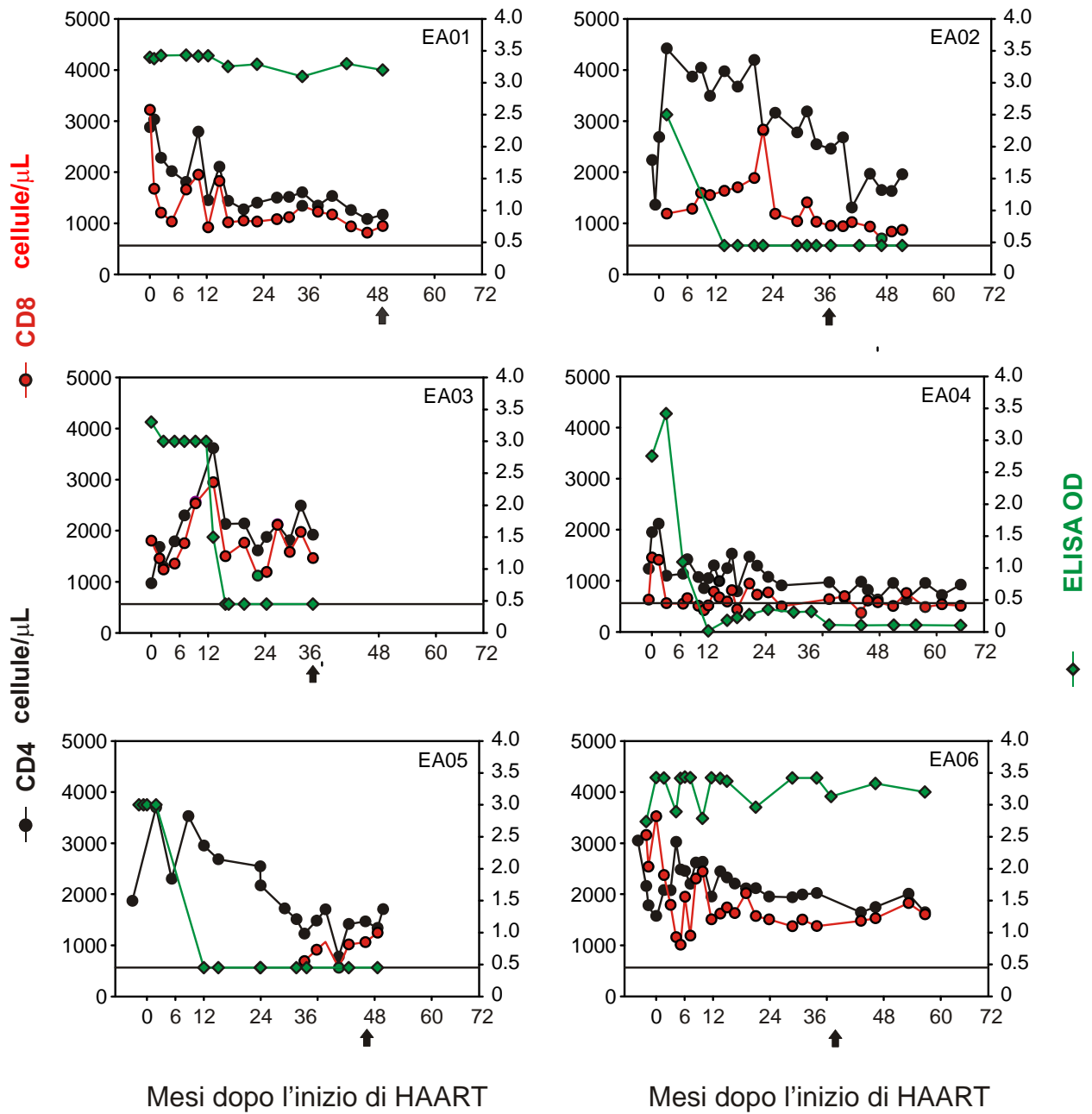
B

Figura 8. Profili virologici ed immunologici dei bambini HIV-1-infetti durante il trattamento precoce con ART. (A) Cinetica di HIV-1 RNA plasmatico, HIV-1 DNA, HIV-1 RNAus, e HIV-1 RNAm. La linea orizzontale rappresenta il limite inferiore di rilevazione del test per l'HIV-1 RNA plasmatico. (B) Numero di cellula T CD4+ e CD8+ e livelli di anticorpi anti-HIV-1 determinati mediante saggio ELISA. Il codice di identificazione dei pazienti è riportato all'interno di ogni pannello. La linea orizzontale rappresenta il limite inferiore di rilevazione del test per gli anticorpi anti-HIV-1. Le frecce in basso indicano il momento in cui è stato effettuato il saggio ELiSpot. OD, densità ottica.

Tabella 3. Risposta HIV-1-peptide specifica dei linfociti T CD8+ in bambini trattati precocemente con HAART. I valori sono espressi come cellule formanti spot (SFC)/10⁶ cellule

Pazienti	peptidi HLA-A2															
	POL 125	ENV 731	POL 438	POL 306	GAG 282	POL 762	POL 176	POL 397	POL 156	POL 764	ENV 134	NEF 158	POL 175	POL 869	POL 476	GAG 77
EA01 (49)*	-	-	-	-	-	-	215	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EA02 (33)*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EA03 (34)*	150	-	135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EA05 (38)*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	50	20
EA06 (37)*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* il tempo (espresso in mesi) in cui è stato effettuato il saggio EliSpot

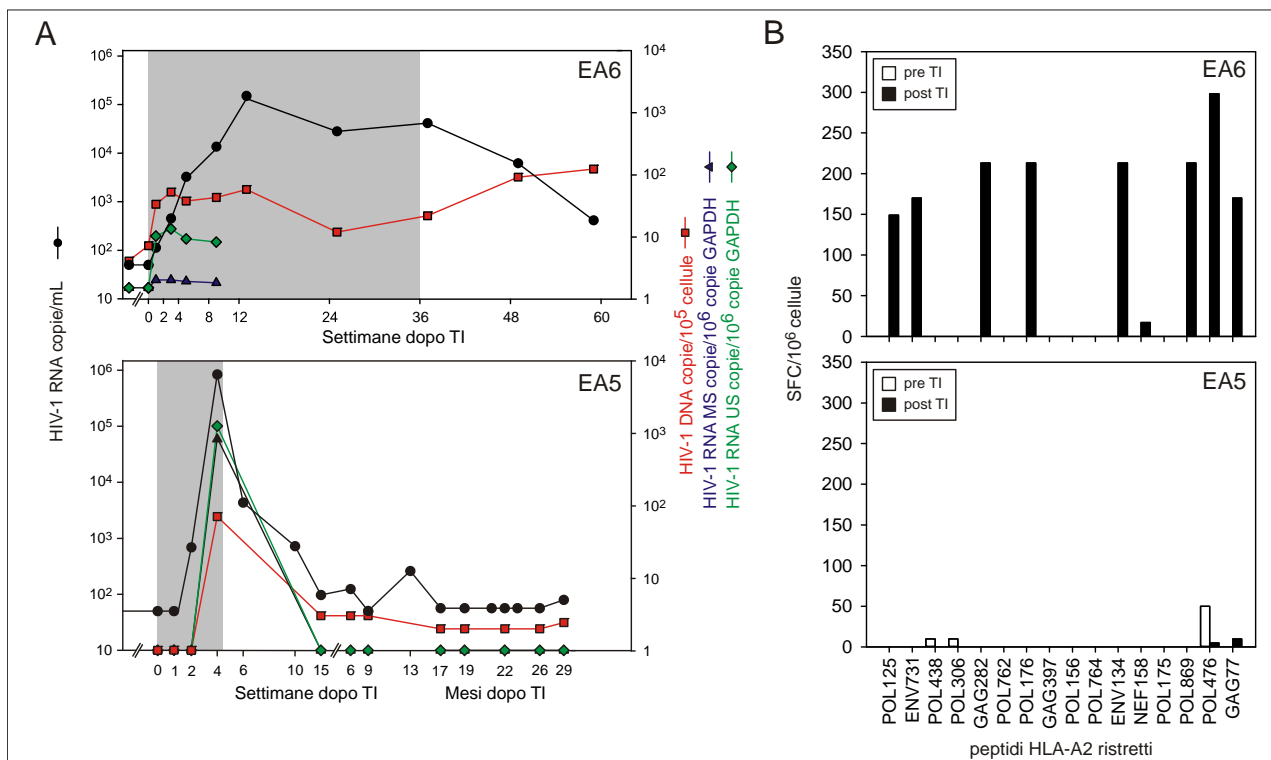


Figura 9. Cinetica della replicazione virale durante l'interruzione di terapia (TI). (A) Variazione di HIV-1 RNA plasmatico e dei livelli intra-cellulari di HIV-1 DNA, HIV-1 RNAus e HIV-1 RNAs in un bambino HIV-1-infetto sieropositivo (EA6) e uno sieronegativo (EA5). L'area grigia indica il periodo di TI. (B) Risposta dei linfociti T CD8+ ai peptidi di HIV-1 determinata mediante saggio EliSpot prima (colonna bianca) e dopo (colonna nera) TI. I risultati sono espressi in cellule formanti spot (SFC)/10⁶ cellule.

Tabella 4. Terapia antiretrovirale altamente efficace (HAART) somministrata a 30 bambini HIV-1-infetti di cui 14 rispondenti virologici (VR9 e 16 non rispondenti virologici (VNR)

Pazienti VR		Pazienti VNR		
Paziente	Regime terapeutico	Paziente	Regime terapeutico	Variazione della terapia
VR1	3TC, d4T, RTV	VNR1	AZT, 3TC, RTV	3TC, d4T, NFV
VR2	AZT, 3TC, RTV	VNR2	3TC, d4T, NFV	-
VR3	3TC, d4T, IDV	VNR3	3TC, d4T, RTV	AZT, 3TC, NFV
VR4	AZT, 3TC, NFV	VNR4	AZT, 3TC, IDV	3TC, d4T, NFV
VR5	AZT, 3TC, NFV	VNR5	AZT, 3TC, NFV	-
VR6	3TC, d4T, NFV	VNR6	3TC, d4T, NFV	3TC, d4T, RTV
VR7	AZT, 3TC, NFV	VNR7	3TC, d4T, IDV	-
VR8	3TC, d4T, RTV	VNR8	3TC, d4T, IDV	3TC, d4T, NFV
VR9	AZT, 3TC, NFV	VNR9	AZT, 3TC, RTV	AZT, 3TC, NFV
VR10	3TC, d4T, IDV	VNR10	3TC, d4T, NFV	-
VR11	AZT, 3TC, NFV	VNR11	3TC, d4T, NFV	-
VR12	AZT, 3TC, RTV	VNR12	3TC, d4T, NFV	-
VR13	AZT, NVP, IDV	VNR13	3TC, d4T, RTV	3TC, d4T, IDV
VR14	3TC, d4T, NFV	VNR14	3TC, d4T, NFV	-
		VNR15	AZT, 3TC, IDV	3TC, d4T, RTV
		VNR16	3TC, d4T, NFV	3TC, d4T, RTV

AZT, zidovudina; d4T, stavudina; IDV, indinavir; NFV, nelfinavir; NVP, nevirapina; RTV, ritonavir; 3TC, lamivudina.

Tabella 5. Caratteristiche immunologiche e virologiche della popolazione pediatrica HIV-1-infetta in trattamento con HAART

Caratteristiche	Gruppo di controllo*	Bambini HIV-1-infetti prima di HAART	P ^a	Rispondenti virologici		P ^b	Non rispondenti virologici		P ^b
				Baseline	Dopo HAART		Baseline	Dopo HAART	
Numero di bambini	17	30		14	14		16	16	
Età in anni	8.7 (2.5-17)	9.3 (2-14)		9.4 (2.8-14.2)	11.8 (4.8-16)		6.4 (2-14)	8.4 (4-17)	
Sottopopolazioni linfocitarie									
% CD4 ⁺	28.8 (11-49)	10 (0-34)	<0.001	13.3 (0-34)	28.8 (18-49)	<0.001	7.4 (2.5-29)	17.6 (6.5-35.7)	0.001
CD4 ⁺ /μl	750 (369-2338)	272 (5-916)	<0.001	345 (5-571)	686 (439-1851)	<0.001	210 (10-916)	433 (63-1126)	0.008
% CD8 ⁺	17.5 (9.9-29.1)	44 (6-72)	<0.001	42.6 (25-72)	32.3 (19-54)	0.003	46 (20-58)	51 (23-70)	0.387
CD8 ⁺ /μl	509 (239-1884)	739 (99-3664)	0.12	702 (225-2046)	858 (286-1570)	0.391	896 (99-3664)	1078 (284-3451)	0.332
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.9 (1-3.1)	0.4 (0.1-1.2)	<0.001	0.4 (0.1-1.2)	1 (0.4-2)	<0.001	0.3 (0.1-0.9)	0.6 (0.1-1.3)	0.004
HIV-1 RNA log ₁₀ copie/ml	-	4.5 (2.6-6.1)	-	4.3 (3.2-5.6)	1.6 (1.6-2.4)	<0.001	4.9 (2.6-6.1)	4.7 (2.9-5.6)	0.033

*Gruppo di controllo: bambini non infetti. I valori sono stati espressi come mediane (range). P^a tra il gruppo di controllo e tutti i bambini HIV-1-infetti prima dell'inizio della terapia. P^b tra il baseline e dopo l'inizio della terapia in bambini VR e VNR.

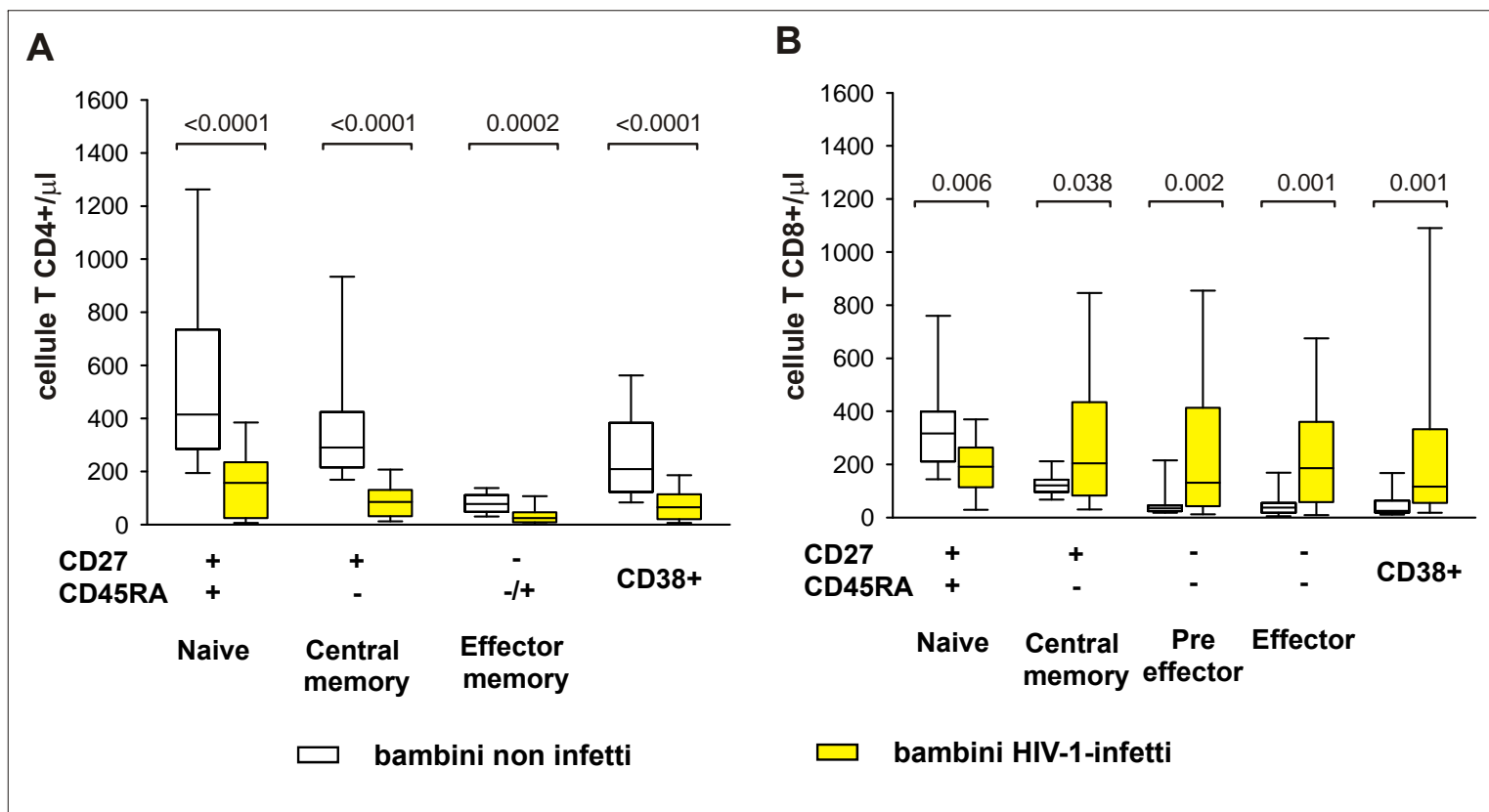


Figura 10. Caratteristiche fenotipiche delle sottopopolazioni cellulari T CD4+ e CD8+ in 17 bambini non infetti e 30 bambini HIV-1-infetti prima dell'inizio di HAART. L'espressione di CD27, CD45RA e CD38 è stata analizzata nelle cellule T CD3+CD4+ (A) e CD3+CD8+ (B). I rettangoli e le barrette rappresentano rispettivamente 25th-75th e 10th-90th percentile; la linea centrale è la mediana. *P* è stato determinato con il test Mann-Whitney.

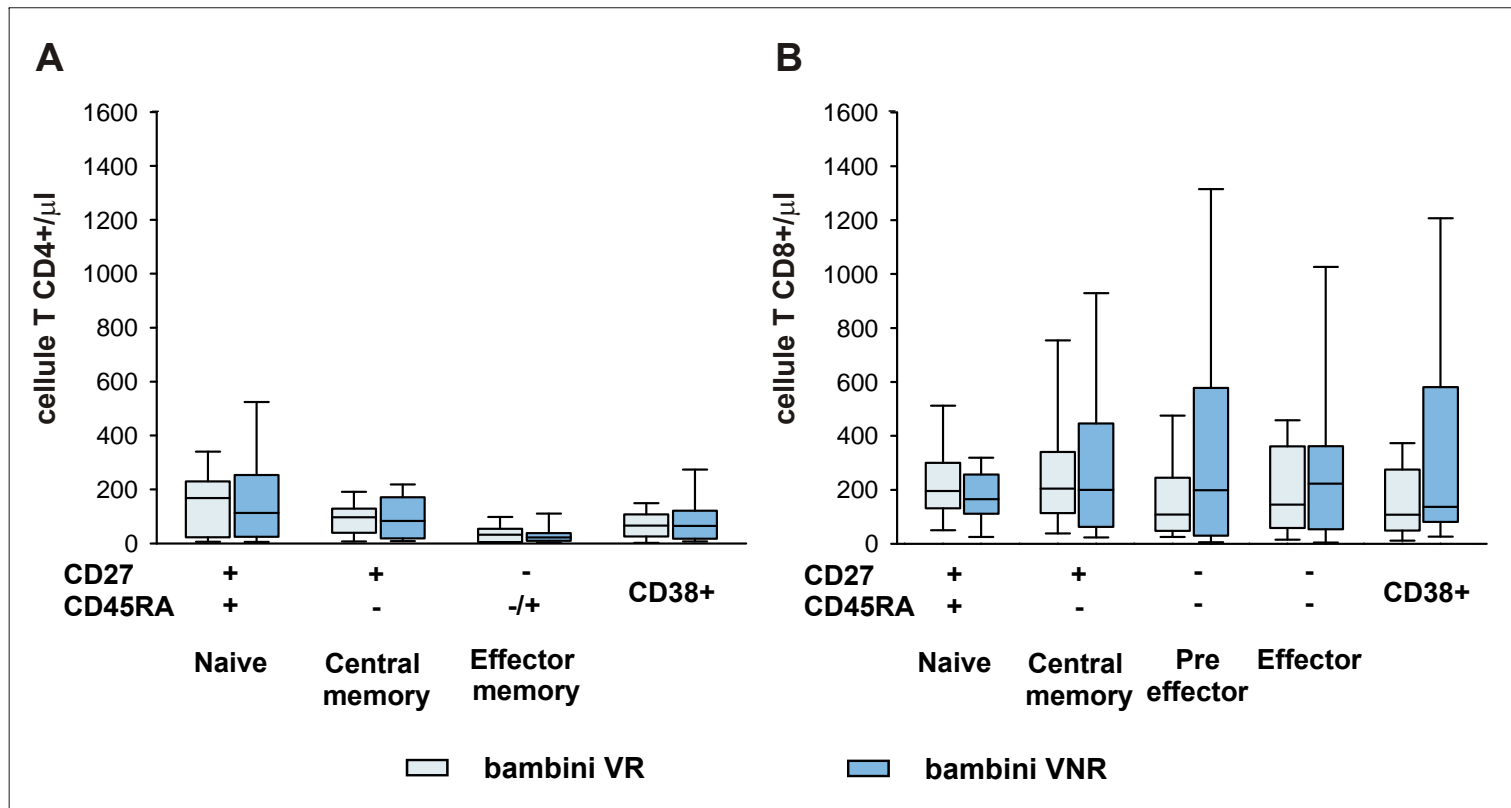


Figura 11. Sottopopolazioni cellulari T CD4+ (A) e CD8+ (B) in 14 bambini VR e in 16 bambini VNR prima dell'inizio di HAART. I rettangoli e le barrette rappresentano rispettivamente 25th-75th e 10th-90th percentile; la linea centrale è la mediana. *P* è stato determinato con il test Mann-Whitney.

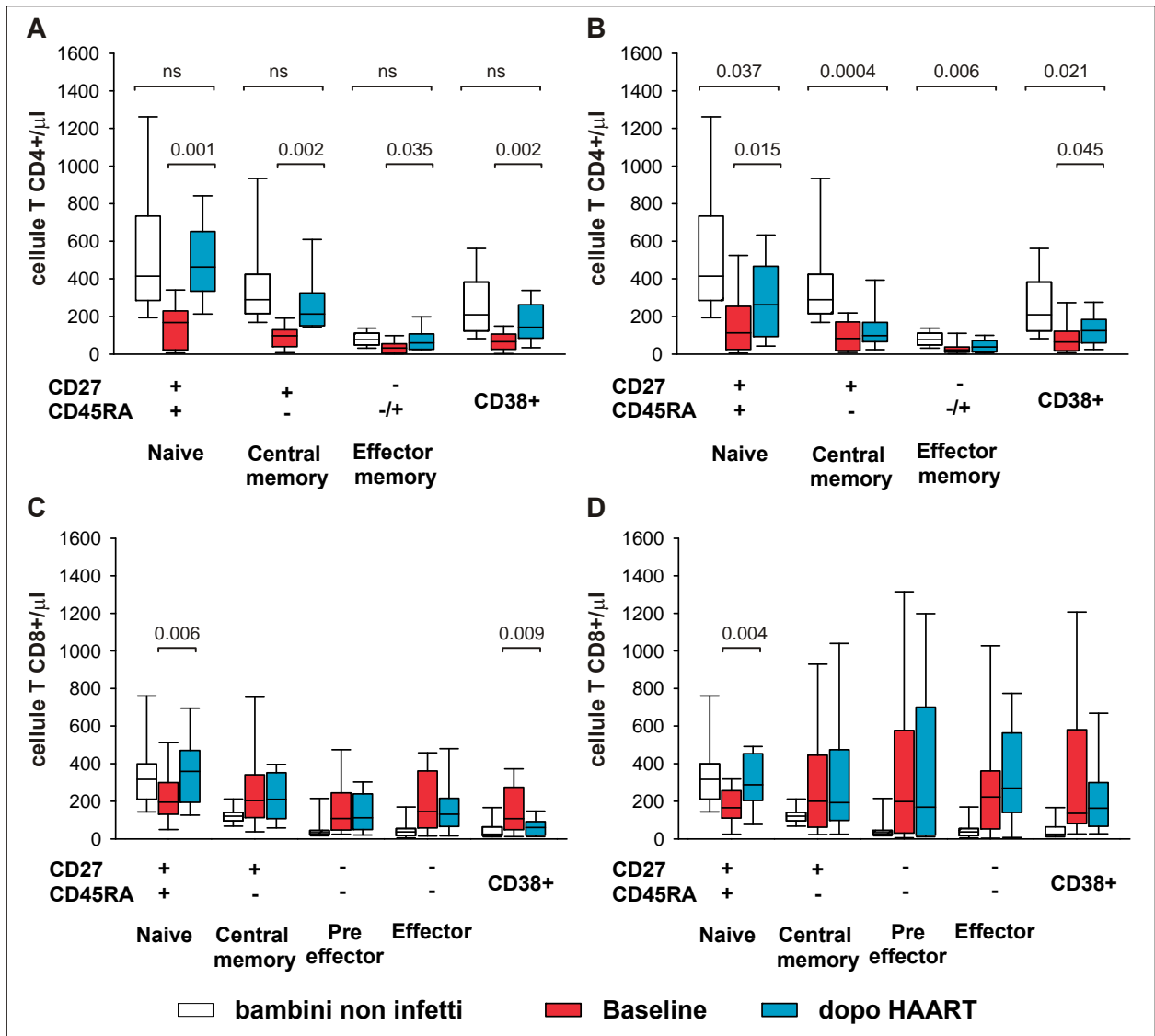


Figura 12. Ripopolazione delle cellule T in bambini VR e VNR. L'espressione di CD27, CD45RA e CD38 in cellule T CD3+CD4+ T (A e B) e CD3+CD8+ (C e D) sono stati analizzati in 14 bambini VR (A e C) e 16 VNR (B e D) prima e dopo 2 anni di HAART. I dati sono stati confrontati con quelli ottenuti da 17 bambini non infetti. I rettangoli e le barrette rappresentano rispettivamente 25th-75th e 10th-90th percentile; la linea centrale è la mediana. *P* sono stati determinati con i test Wilcoxon e Mann-Whitney.

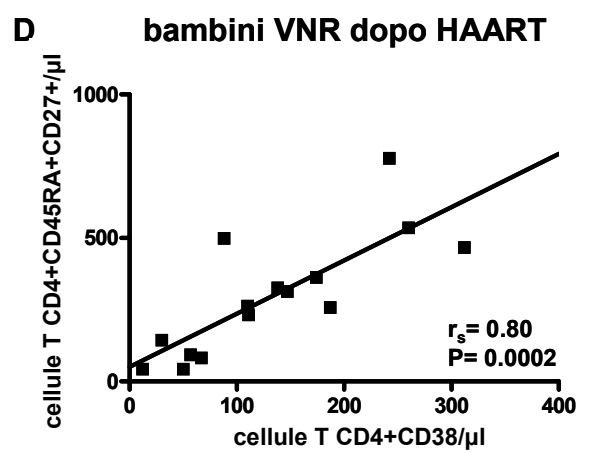
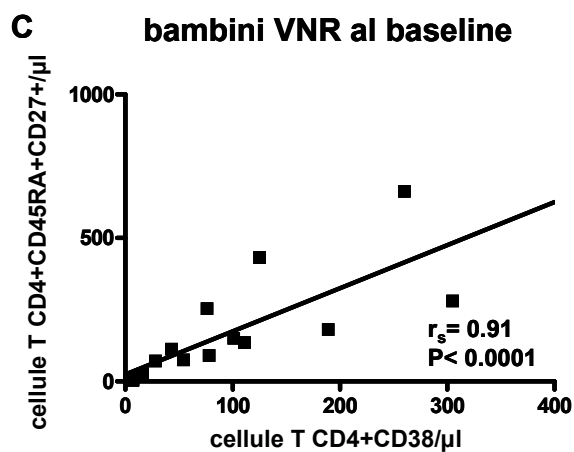
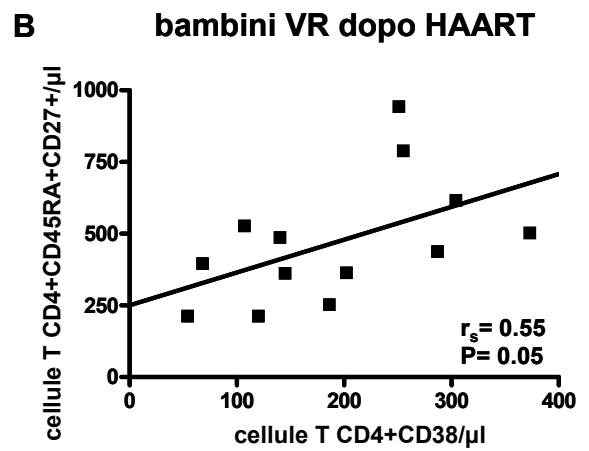
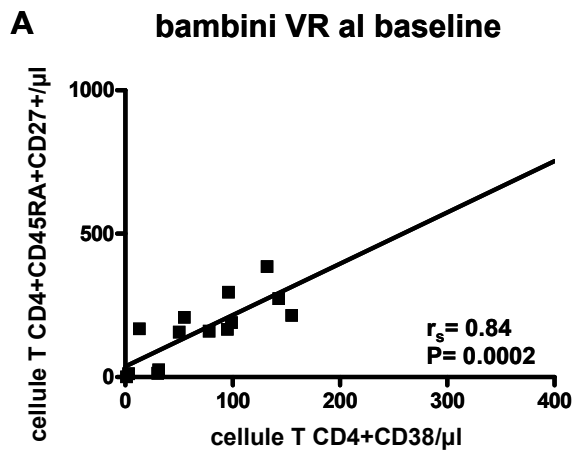


Figura 13. Relazione tra il numero di cellule T CD4+ naive (CD45RA+CD27+) e CD4+CD38+ in 14 bambini VR e in 16 VNR. La correlazione tra questi parametri è riportata nel gruppo VR prima (A) e dopo HAART (B) e nel VNR (rispettivamente in C e D). r_s , coefficiente di correlazione di Spearman.

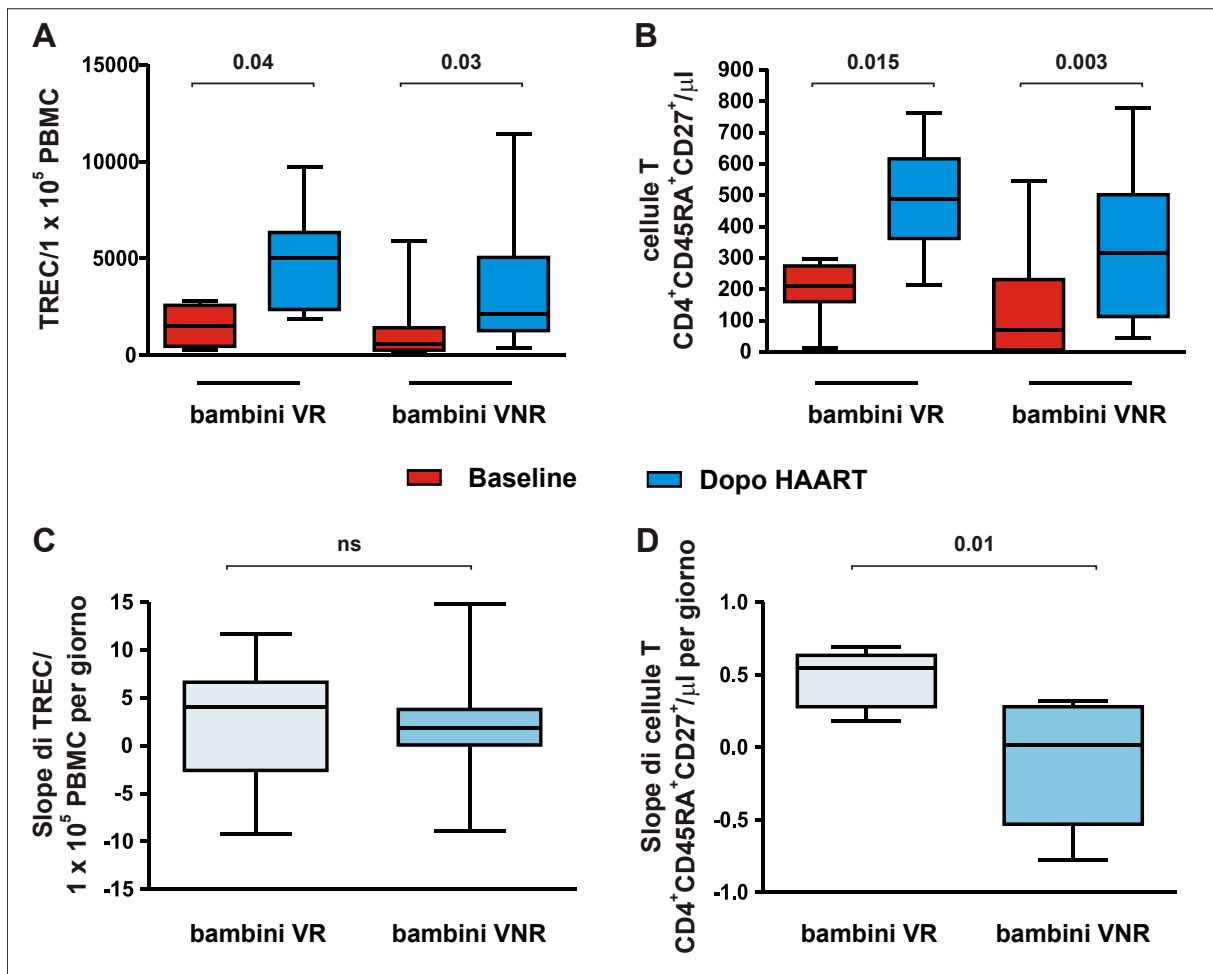


Figura 14. Dinamica dell'output timico e delle cellule T CD4+CD45RA+CD27+ in 6 bambini VR e 7 VNR. I livelli di TREC (A) e delle cellule T CD4+ naive (B) sono stati analizzati prima e dopo 2 anni di HAART. La pendenza (slope) di TREC (C) e delle cellule T CD4+CD45RA+CD27+ (D) nei bambini VR e VNR. I rettangoli e le barrette rappresentano rispettivamente 25th-75th e 10th-90th percentile; la linea centrale è la mediana. *P* sono stati determinati con i test Wilcoxon (A e B) e Mann-Whitney U (C e D).

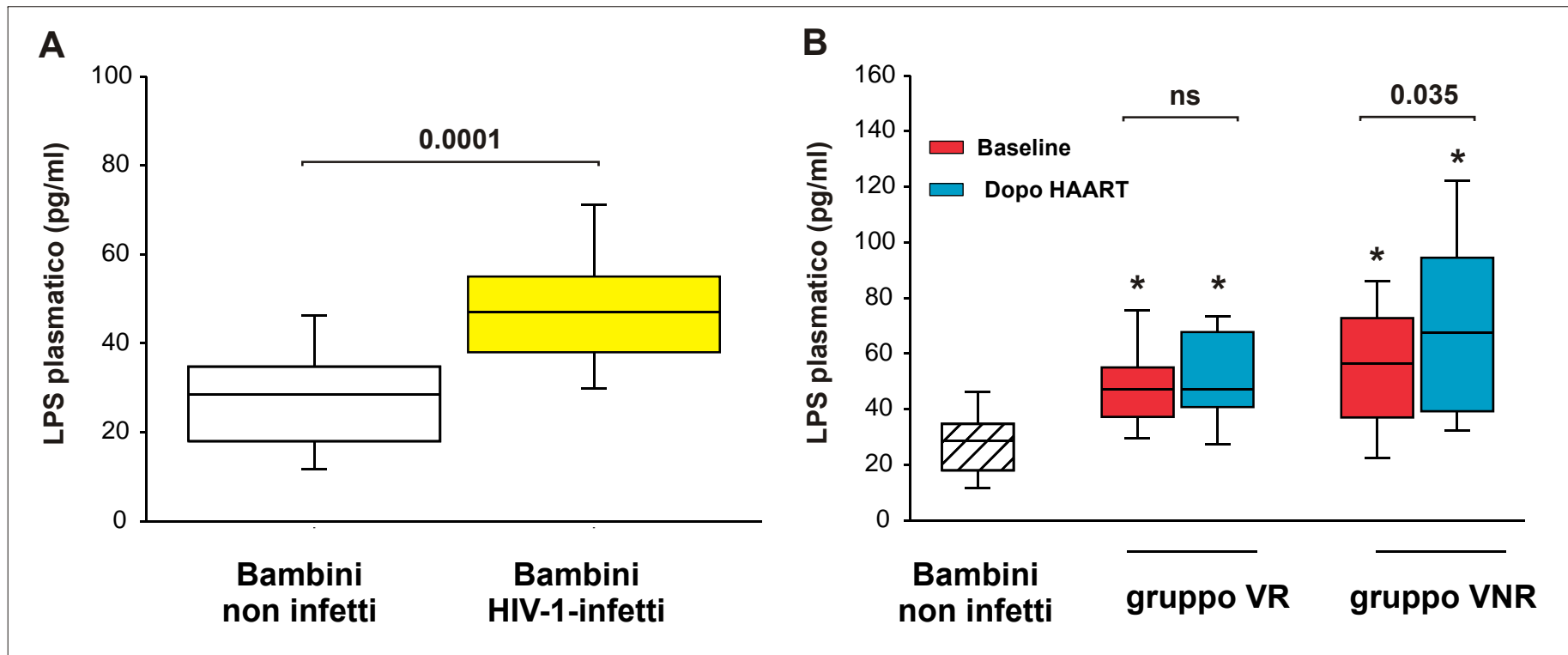


Figura 15. Translocazione microbica in bambini HIV-1-infetti. I livelli plasmatici di LPS sono stati determinati in bambini non infettati e in bambini HIV-1-infetti prima dell'inizio di HAART (A) ed in pazienti VR e VNR prima e dopo la terapia (B). I rettangoli e le barrette rappresentano rispettivamente 25th-75th e 10th-90th percentile; la linea centrale è la mediana. * $P < 0.001$ comparando il gruppo di controllo con i bambini HIV-1-infetti.

7. DISCUSSIONE

L'infezione perinatale da HIV-1 è acquisita quando il sistema immunitario del bambino è in fase di sviluppo ed è caratterizzata da un'elevata e non controllata replicazione virale; tutto ciò conduce ad una rapida progressione della malattia in assenza di ART [29]. Una diagnosi molto precoce ed un trattamento terapeutico efficace durante l'infezione primaria potrebbero diminuire la diffusione del virus nell'organismo e preservare la funzione immunitaria riducendo, pertanto, la progressione clinica della malattia. Sebbene l'introduzione di HAART abbia modificato enormemente il corso dell'infezione da HIV-1 nell'adulto e nel bambino, permettendo una riduzione della VL sino a dei valori non rilevabili ed un recupero periferico dei linfociti T CD4+, sono poche le informazioni presenti in letteratura sulla sua efficacia durante l'infezione primaria nel bambino. Non sono chiari, inoltre, i meccanismi che sostengono l'immunoricostruzione in presenza di fallimento virologico della terapia nell'infezione pediatrica da HIV-1.

Al fine di incrementare le scarse informazioni sull'effetto della somministrazione precoce di ART sulla progressione dell'infezione perinatale da HIV-1 abbiamo analizzato la dinamica virale e la risposta immunitaria in neonati che hanno iniziato la terapia antiretrovirale entro i 3 mesi di età. Tutti i bambini hanno mostrato una risposta virologica a HAART: dopo il declino iniziale della VL, è stata osservata una prolungata soppressione della replicazione virale, che rimaneva costantemente non rilevabile, ad eccezione di sporadici blips durante il lungo follow-up. Tali risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura [58]. Sebbene i bambini fossero aviremici, l'HIV-1 DNA è stato persistentemente rilevato nei PBMC di 4 bambini su 6. Questa costante presenza potrebbe essere causata da cellule latentemente infettate con una lunga emivita e/o da nuove cellule infettate [88]. In 4 bambini i markers per la replicazione virale (HIV-1 RNA_{us} e HIV-1 RNA_{ms}) erano costantemente

negativi; tuttavia l'assenza di HIV-1 mRNA non può escludere la presenza di una replicazione virale inferiore ai limiti di rilevazione.

Per quanto riguarda la risposta immunitaria al virus, solo 2 neonati, in cui erano stati rilevati gli mRNA virali, risultavano sieropositivi per tutto il follow-up, gli altri bambini dopo la perdita degli anticorpi materni rimanevano sieronegativi in quanto non sviluppavano propri anticorpi anti-HIV-1. Inoltre, in tutti i bambini era pressoché ridotta o assente la risposta dei linfociti T CD8+ verso la maggior parte di epitopi di HIV-1 testati. Tale fenomeno potrebbe essere dovuto ad una sottostima a causa dell'utilizzo di peptidi HLA-A2-ristretti; tuttavia questo approccio ha permesso di analizzare nella nostra corte 5 bambini su 6. Un recente studio ha evidenziato che nell'adulto la somministrazione di ART durante la fase primaria dell'infezione da HIV-1 è associata ad una soppressione virale prolungata nel tempo e, in pochi casi, ad una incompleta risposta umorale al virus che potrebbe essere causata da una stimolazione antigenica insufficiente a sostenere una risposta HIV-1-specifica umorale [89]. Di conseguenza, l'assenza di una risposta HIV-1-specifica umorale e cellulare nei bambini in HAART precoce potrebbe riflettere la mancanza di una appropriata stimolazione antigenica (sia in termini di durata che di intensità) che permetta lo sviluppo di una risposta specifica in un sistema immunitario immaturo [19]. A sostegno di tale ipotesi, uno studio effettuato in bambini che avevano iniziato ART ad 1 anno di età ha evidenziato che la risposta HIV-1-specifica delle cellule T CD8+ era dipendente dalla carica virale. Al contrario, nei pochi studi effettuati in neonati che hanno iniziato ART entro i 3 mesi di vita, la risposta delle cellule T CD8+ era molto ridotta indipendentemente dai livelli della viremia plasmatica [90]. Questo suggerisce che l'inizio della terapia nel primo mese di vita potrebbe alterare il "livello soglia" del virus necessario ad innescare una risposta immunitaria HIV-1-specifica.

L'analisi della cinetica virale nel plasma e nei PBMC durante l'interruzione di terapia (TI) ha evidenziato una differente risposta virologica ed immunologica nel bambino

sieropositivo rispetto a quello sieronegativo. Nel bambino sieropositivo (EA06) vi era un rapido aumento di HIV-1 DNA e di HIV-1 RNA_{us} che precedeva l'incremento della viremia indicando una costante presenza di cellule infettate nel sangue in cui il virus inizia a replicare quando viene interrotta la terapia. Nel bambino sieronegativo (EA05), l'aumento della viremia precedeva quello nei PBMC indicando presumibilmente che le cellule latentemente infettate erano in un compartimento differente da quello sanguigno [91]. E' interessante notare che la risposta cellulare HIV-1-specifica è stata riscontrata solo nel bambino che è rimasto in TI per 36 settimane mentre era pressoché assente in quello che era rimasto per un breve tempo in TI. Questi dati supportano l'ipotesi che l'intensità e la durata dell'esposizione ad antigeni virali sia cruciale per innescare una risposta immunitaria contro HIV-1.

L'immuno-ripopolazione indotta da HAART nel bambino può avvenire anche in presenza di una persistente replicazione virale [64,68-72]. Al fine di incrementare le scarse informazioni sull'immunoricostruzione in bambini HIV-1-infetti, abbiamo investigato sulla ripopolazione periferica del sistema immunitario in presenza ed in assenza di una risposta virologica alla terapia. Nello studio abbiamo dimostrato che l'immunoricostruzione nei bambini VR e nei VNR è completamente differente a livello del compartimento cellulare T CD4⁺ e CD8⁺. L'immuno-attivazione, inoltre, diminuiva nei pazienti VR, mentre nei VNR rimaneva elevata e tendeva ad aumentare.

Prima di iniziare HAART, i pazienti VR e VNR avevano valori simili di VL plasmatica e non mostravano differenze sia all'interno delle sottopopolazioni T sia nei livelli di TREC. Quando i pazienti venivano comparati con il gruppo di controllo, si osservava nei bambini VR e VNR una deplezione in tutte le sottopopolazioni cellulari T CD4⁺ ma un aumento in tutte le sottopopolazioni T CD8⁺ ad eccezione delle cellule naive. I pazienti, inoltre, mostravano un elevato numero di cellule T CD8⁺CD38⁺ attivate. Questi dati sono in accordo con il concetto

che l'infezione da HIV-1 conduce sia ad una attivazione sia ad un differenziamento dei linfociti T CD8+ spingendoli da naive verso l'ultimo stadio maturativo [92].

Dopo 2 anni di HAART, l'immunoricostituzione nei bambini VR avveniva in tutte le sottopopolazioni cellulare T CD4+, mentre nei VNR avveniva solo a livello delle cellule T CD4+ naive. Un dato interessante è, inoltre, l'aumento significativo dei livelli di TREC rilevato in entrambe i gruppi in studio. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura [64,68,69,71] ed indicano che una persistente viremia durante HAART non impedisce un aumento delle funzionalità timica e, conseguentemente, il rilascio di nuove cellule naive. Una ulteriore conferma è data dall'aumento dei linfociti T CD8+ naive riscontrato sia nei bambini VR sia nei VNR. Tuttavia, l'aumento nei livelli di TREC correlava con l'incremento del numero di cellule T CD4+ naive solo nei bambini VR, in accordo con quanto osservato in *Ometto L, et al; AIDS 2002* [69]. Inoltre, per un simile aumento dei livelli di TREC, l'incremento nelle cellule T CD4+ naive era inferiore nel gruppo dei VNR rispetto ai VR. E' possibile che, in un contesto di persistente replicazione virale, le cellule emigrate dal timo vengano attivate da antigeni virali in circolo, proliferino e si differenzino in cellule memory [93], le quali sono più suscettibili all'infezione da HIV-1 delle naive. Sebbene il meccanismo con cui avvenga la parziale immunoricostituzione nei bambini VNR non sia ben chiaro, è possibile che HAART prevenga la replicazione virale nelle cellule T progenitrici [94,95]; inoltre, la bassa capacità replicativa di virus farmaco-resistenti e la variazione del co-recettore utilizzato dal virus (da CXCR4 espresso nelle cellule naive a CCR5 presente nelle cellule T CD4+ memory) [70,94,96] potrebbero contribuire, probabilmente, alla ripopolazione periferica dei linfociti T CD4+ naive.

L'aumento delle cellule T CD4+CD38+ riscontrato nei bambini VR e VNR correlava positivamente con l'aumento delle cellule T CD4+ naive. A differenza di quanto osservato nell'adulto, questo dato suggerisce che nel bambino il recettore CD38 nei linfociti T CD4+ è

un marker di immaturità cellulare piuttosto che di attivazione [97,98]. A sostegno di ciò, è stato riscontrato che la sua espressione nei linfociti T CD4+ è elevata nelle cellule naive [99], decresce con il passare del tempo [38] ed aumenta durante l'immunoricostituzione [97,98].

In questo studio abbiamo, inoltre dimostrato che la persistente viremia impedisce l'espansione dei linfociti T CD4+ memory ed effector. Nei bambini VR queste sottopopolazioni cellulari aumentavano raggiungendo livelli simili a quelli riscontrati nel controllo non infetto. Tale ripopolazione potrebbe essere dovuta ad una espansione/differenziamento delle cellule T CD4+ memory ed effector, ad una redistribuzione dai tessuti e dai linfonodi alla periferia e ad una riduzione dell'apoptosi [100]. Nei bambini VNR queste popolazioni cellulari invece rimanevano significativamente più basse. Tale fenomeno potrebbe essere dovuto alla costante presenza di virioni in circolo e alla più elevata suscettibilità di queste sottopopolazioni linfocitarie all'infezione da HIV-1 rispetto alle cellule naive [93,101]. La deplezione periferica osservata potrebbe essere anche indotta da una riduzione della proliferazione cellulare e da un incremento della morte cellulare [100]. Sebbene sarebbe stato interessante utilizzare dei markers per quantificare l'apoptosi e la proliferazione cellulare in questi pazienti, purtroppo non è stato possibile a causa dell'esiguo numero di cellule disponibili e della tipologia del campione che era criopreservato.

Per quanto riguarda il compartimento cellulare T CD8+, sebbene nessuna variazione significativa sia stata osservata a livello delle cellule memory e delle 2 sottopopolazioni effettrici, il numero di cellule nei bambini VNR tendeva ad aumentare suggerendo che HIV-1 induca una stimolazione ed una attivazione cronica in questi pazienti. Questa ipotesi è supportata dal dato osservato nei linfociti T CD8+CD38+ attivati che diminuivano significativamente nei pazienti VR mentre rimanevano elevati nei VNR. La riduzione dell'espressione di CD38 rilevata nel gruppo VR potrebbe riflettere una riduzione della stimolazione antigenica causata da una viremia plasmatica non rilevabile [97,102]. A

differenza dell'adulto, nel bambino l'incremento dell'espressione di CD38 durante la terapia antiretrovirale, se nei linfociti T CD4+ è considerato un marker prognostico positivo perché legato ad un aumento di cellule naive, nelle cellule T CD8+, invece, è considerato un marker prognostico negativo in quanto è fortemente associato all'immuno-attivazione [97,103,104].

L'immuno-attivazione è indotta non solo da HIV-1 ma anche da altri patogeni. L'infezione da HIV-1 avviene principalmente a livello del tratto gastro-intestinale dove si verificano delle alterazioni nella componente immunologica presente nella mucosa (rapida deplezione delle cellule T CD4+ effettrici). Questo danno conduce, conseguentemente, ad una translocazione di microbi e di prodotti microbici come LPS, una potente molecola immunostimolatrice che influenza l'attivazione sistemica del sistema immunitario. Al baseline, i livelli di LPS plasmatico erano più elevati nei pazienti rispetto ai bambini non infetti. A differenza di quanto osservato nell'adulto HIV-1-infetto in cui è stata osservata una riduzione dei livelli di LPS durante ART [82], nei bambini VR i livelli plasmatici di LPS rimanevano stabilmente elevati mentre nei VNR tendevano ad aumentare durante HAART. Questi risultati supportano l'ipotesi che la persistente immuno-attivazione nel bambino potrebbe essere causata non solo da antigeni di HIV-1 ma anche da altri patogeni e da prodotti microbici.

In conclusione, la terapia precoce è associata ad un controllo prolungato della replicazione virale e ad un buon risultato sia clinico che immunologico. Tuttavia, la permanenza di HIV-1 nei bambini sieronegativi aviremici conferma che la terapia precoce è incapace di eradicare l'infezione e potrebbe impedire una risposta immunitaria virus-specifica. Questi risultati possono fornire informazioni importanti per pianificare una corretta strategia terapeutica in neonati HIV-1-infetti. L'elevata soppressione della replicazione virale suggerisce che sia possibile semplificare successivamente il regime terapeutico. Tale regime, pertanto, potrebbe essere sufficiente per controllare la replicazione virale a lungo termine ed indurre una risposta immunitaria HIV-1-specifica. L'assenza della risposta immunitaria

osservata in questi pazienti suggerisce anche che la somministrazione di un vaccino terapeutico in grado di indurre una risposta HIV-1-specifica potrebbe essere un ulteriore aiuto per controllare precocemente la replicazione virale. Inoltre l'interruzione della terapia nei neonati trattati precocemente potrebbe essere utilizzata al pari di un vaccino terapeutico per favorire lo sviluppo di una risposta HIV-1-specifica in un sistema immunitario immaturo ed in via di sviluppo. Abbiamo dimostrato, inoltre, che la somministrazione prolungata di HAART in bambini HIV-1-infetti induce una immuno-ripopolazione in tutte le sottopopolazioni T CD4+ solo nei pazienti che mostrano una risposta virologica alla terapia. La persistente viremia non sembra avere effetto sull'output timico e sull'aumento delle cellule T CD4+ e CD8+ naive ma impedisce l'espansione periferica nelle altre sottopopolazioni cellulari T CD4+. La costante presenza di virioni e di antigeni di HIV-1, insieme ai prodotti microbici in circolo, sostengono gli elevati livelli di cellule T CD8+CD38+ attivate. La persistenza dell'immuno-attivazione potrebbe in seguito determinare la progressione in AIDS. Infine, nei bambini, l'espressione di CD38 nella popolazione linfocitaria T CD4+ e CD8+ potrebbe essere un utile marker prognostico predittivo sull'efficienza della terapia antiretrovirale somministrata.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Klatt ED, MD. Department of Pathology University of Utah. Pathology of AIDS. Version 7, 1998.
2. Little K, Newell M, Luo C, et al. Estimating the number of vertically HIV-infected children eligible for antiretroviral treatment in resource-limited settings. *Int J Epidemiol* 2007; 36:679-87.
3. Quinn TC. Global burden of the AIDS pandemic. *Lancet* 1996; 348:276.
4. Ruprecht RM, Baba TW, Rasmussen R, et al. Murine and simian retrovirus models: the threshold hypothesis. *AIDS* 1996; 10 suppl A: 33-40.
5. Tran HK, Chartier L, Troung LX, et al. Systemic immune activation in HIV-1-exposed uninfected Vietnamese intravenous drug users. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22:255-61.
6. Cao Y, Qin L, Zhang L, et al. Virological and immunological characterisation of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995; 332:201-208.
7. Keoshkerian E, Ashton LJ, Smith DG, et al. Effector HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in long-term nonprogressors: associations with viral replication and progression. *J Med Virol* 2003; 71:483-91.
8. Ho DD. Dynamics of HIV-1 replication *in vivo*. *J Clin Invest* 1997; 11:2565-2567.
9. Karlsson A, Deeks S, Barbour J, et al. . Dual pressure from antiretroviral therapy and cell-mediated immune response on the human immunodeficiency virus type 1 protease gene. *J Virol* 2003; 77:6743-52.
10. Guadalupe M, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003; 77:11708-717.
11. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul W and Picker L. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 2006; 12:289-295.
12. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004; 200:749-59.
13. Sallusto F, Lenig D, Forster R, et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401:708-712.
14. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004; 200:761-70.
15. Kunkel EJ, Boisvert J, Murphy K, et al. Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am J Pathol* 2002; 160:347-55.
16. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, et al. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994; 68, 6103-6110.
17. Gandhi RT and Walker BD. Immunologic Control of HIV-1. *Annu Rev Med* 2002; 53:149-72.
18. Kostense S, Vandenberghe K, Joling J, et al. Persistent numbers of tetramer+ CD8+ T cells, but loss of interferon-gamma+ HIV-specific T cells during progression to AIDS. *Blood* 2002; 99:2505-2511.
19. Sandberg JK, Fast NM, Jordan KA, et al. HIV-specific CD8+ T cell function in children with vertically acquired HIV-1 infection is critically influenced by age and the state of the CD4+ T cell compartment. *J Immunol* 2003; 170:4403-4410.
20. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, et al. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000; 192:63-75.

21. Champagne P, Ogg GS, King AS, et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 2001; 410: 106–111.
22. D'Offizi G, Montesano C, Agrati C, et al. Expansion of pre-terminally differentiated CD8 T cells in chronic HIV-positive patients presenting a rapid viral rebound during structured treatment interruption. *AIDS* 2002; 16:2431-8.
23. Papagno L, Spina CA, Marchant A, et al. Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol.* 2004; 2, E20.
24. De Rosa SC, Herzenberg LA, Herzenberg LA, et al. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat Med.* 2001; 7:245-8.
25. Hintzen RQ, De Jong R, Lens SM, et al. Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J Immunol* 1993; 151:2426-35.
26. Hamann D, Baars PA, Rep MH, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 1997; 186:1407-18.
27. Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 2003; 4:225-34.
28. Schiödt A, Lindstedt M, Johansson-Lindbom B, et al. CD27-CD4+ memory T cells define a differentiated memory population at both the functional and transcriptional levels. *Immunology* 2004; 113:363-70.
29. De Rossi A, Masiero S, Giaquinto C, et al. Dynamics of viral replication in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Invest* 1996; 97:323–30.
30. Lohman BL, Slyker JA, Richardson BA, et al. Longitudinal assessment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon responses during the first year of life in HIV-1-infected infants. *J Virol* 2005; 79:8121-8130.
31. Luzuriaga K, McManus M, Catalina M, et al. Early therapy of vertical human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: control of viral replication and absence of persistent HIV-1-specific responses. *J Virol* 2000; 74:6984-6991.
32. Schramm DB, Meddows-Taylor S, Gray GE, et al. Low maternal viral loads and reduced granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels characterize exposed, uninfected infants who develop protective human immunodeficiency virus type 1-specific responses. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 348-354.
33. Pizzo P, Wilfert CM. Markers and determinants of disease progression in children with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 8:30–44.
34. Krivine A, Firtion G, Cao L, et al. HIV replication during the first weeks of life. *Lancet* 1992; 339:1197-1189.
35. Mofenson LM, Korelitz J, Meyer WA 3rd, et al. The relationship between serum human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA level, CD4 lymphocyte percent, and long-term mortality risk in HIV-1-infected children. National Institute of Child Health and Human Development Intravenous Immunoglobulin Clinical Trial Study Group. *J Infect Dis* 1997; 175:1029-38.
36. HIV Paediatric Prognostic Markers Collaborative Study Group. Short-term risk of disease progression in HIV-1-infected children receiving no antiretroviral therapy or zidovudine monotherapy: estimates according to CD4 percent, viral load, and age. *Lancet* 2003; 362: 1605-1611.
37. Abrams E, Weedon J, Steketee R, et al. Association of human immunodeficiency virus (HIV) load early in life with disease progression among HIV-infected infants. *J Infect Dis* 1998; 178:101–108.
38. De Vries E, De Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM, et al. Longitudinal survey of lymphocyte subpopulations in the first year of life. *Pediatr Res* 2000; 47:528–537.
39. HIV Paediatric Prognostic Markers Collaborative Study Groups. Predictive value of absolute CD4 cell count for disease progression in untreated HIV-1-infected children. *AIDS* 2006; 20:1289-94.
40. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, et al. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272:1167–1170.

41. European Collaborative Study. Level and pattern of HIV-1-RNA viral load over age: differences between girls and boys? *AIDS* 2002; 16:97–104.
42. Palella F, Delaney K, Moorman A, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1998; 338:853-860.
43. Eron JJ, Yetzer ES, Ruane PJ, et al. Efficacy, safety, and adherence with a twice-daily combination lamivudine/zidovudine tablet formulation, plus a protease inhibitor, in HIV infection. *AIDS* 2000; 14:671-81.
44. Zhang L, Ramratnam B, Tenner-Racz K, et al. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999; 340:1605–1613.
45. Zanchetta M, Walker S, Burighel N, et al. Long-term decay of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reservoir in HIV-1-infected children treated with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2006; 193:1718–1727.
46. Persaud D, Pierson T, Ruff C, et al. A stable latent reservoir for HIV-1 in resting CD4(+) T lymphocytes in infected children. *J Clin Invest* 2000; 105:995-1003.
47. Blankson JN, Finzi D, Pierson TC, et al. Biphasic decay of latently infected CD4+ T cells in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2000; 182:1636-42.
48. Pillay D, Walker AS, Gibb DM, et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtypes on virologic response and emergence of drug resistance among children in the Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) 5 trial. *J Infect Dis* 2002; 186:617-25.
49. Gibb DM, Walker AS, Kaye S, et al. Evolution of antiretroviral phenotypic and genotypic drug resistance in antiretroviral-naive HIV-1-infected children treated with abacavir/lamivudine, zidovudine/lamivudine or abacavir/zidovudine, with or without nelfinavir (the PENTA 5 trial). *Antivir Ther* 2002; 7:293-303.
50. Lee KJ, Shingadia D, Walker AS, et al. Transient viral load increases in HIV-infected children in the U.K. and Ireland: what do they mean? *Antivir Ther* 2007;12:949-56.
51. Lillo FB, Ciuffreda D, Veglia F, et al. Viral load and burden modification following early antiretroviral therapy of primary HIV-1 infection. *AIDS* 1999; 13:791–796.
52. Ngo-Giang-Huong N, Deveau C, Da Silva I, et al. Proviral HIV-1 DNA in subjects followed since primary HIV-1 infection who suppress plasma viral load after one year of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; 15:665-673.
53. Oxenius A, Price DA, Easterbrook PJ, et al. Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3382–7.
54. Alter G, Hatzakis G, Tsoukas CM, et al. Longitudinal assessment of changes in HIV-specific effector activity in HIV-infected patients starting highly active antiretroviral therapy in primary infection. *J Immunol* 2003; 171:477-88.
55. Van Rompay KK, Dailey PJ, Tarara RP, et al. Early short-term 9-[2-(R)-(phosphonomethoxy) propyl]adenine treatment favourably alters the subsequent disease course in simian immunodeficiency virus-infected newborn rhesus macaques. *J Virol* 1999; 73:2947–2955.
56. Aboulker JP, Babiker A, Chaix ML, et al. Highly active antiretroviral therapy started in infants under 3 months of age: 72-week follow-up for CD4 cell count, viral load and drug resistance outcome. *AIDS* 2004; 18:237-45.
57. Deveau C, Goujard C, Ngo N, et al. Clinical and virological response in 133 patients recruited and treated with HAART during HIV-1 primary infection: the PRIMO cohort. XIII International Conference on AIDS. Durban 2000 [abstract WeOrB614].
58. Luzuriaga K, McManus M, Mofeson L, et al, for the PACTG 356 Investigators. A trial of three antiretroviral regimens in HIV-1 infected children. *N Engl J Med* 2004; 350:2471–2480.

59. Pakker NG, Notermans DW, De Boer RJ, et al. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med*.1998; 4:208–214.
60. Choremi-Papadopoulou H, Tsalimalma K, Dafni U, et al. Limited long-term naive CD4+ T cell reconstitution in patients experiencing viral load rebounds during HAART. *J Med Virol* 2004; 73:235-243.
61. Haynes BF, Markert ML, Sempowski GD, et al. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:529-560.
62. Franco JM, Rubio A, Martínez-Moya M, et al. T-cell repopulation and thymic volume in HIV-1-infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. *Blood* 2002; 99:3702-6.
63. Gibb DM, Newberry A, Klein N, et al. Immune repopulation after HAART in previously untreated HIV-1 infected children. *Lancet* 2000;355:1331–2.
64. De Rossi A, Walker AS, Klein N, et al. Increased thymic output after initiation of antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected children in the Paediatric European Network for treatment of AIDS (PENTA) 5 trial. *J Infect Dis* 2002; 186:312–20.
65. Viganò A, Vella S, Principi N, et al. Thymus volume correlates with the progression of vertical HIV infection. *AIDS* 1999; 13: F29–34.
66. Okazaki K, Davis DD, Sakano H. T cell receptor beta gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell* 1987; 49:477-485.
67. Douek DC, Koup RA, McFarland RD, Sullivan JL, Luzuriaga K. Effect of HIV on thymic function before and after antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis* 2000;181:1479-82.
68. Chavan S, Bennuri B, Kharbanda M, et al. Evaluation of T cell receptor gene rearrangement excision circles after antiretroviral therapy in children infected with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2001;183:1445–54.
69. Ometto L, De Forni D, Patiri F et al. Immune reconstitution in HIV-1-infected children on antiretroviral therapy: role of thymic output and viral fitness. *AIDS* 2002; 16:839–49.
70. Bagnarelli P, Vecchi M, Burighel N et al. Genotypic and phenotypic correlates of the HIV type 1 env gene evolution in infected children with discordant response to antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20:1306–13.
71. Resino S, Galan I, Perez A et al. HIV-infected children with moderate/severe immune-suppression: changes in the immune system after highly active antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 2004; 137:570–7.
72. Ghaffari G, Passalacqua DJ, Caicedo JL, et al. Two-year clinical and immune outcomes in human immunodeficiency virus-infected children who reconstitute CD4 T cells without control of viral replication after combination antiretroviral therapy. *Pediatrics* 2004; 114:604–11.
73. Stoddart CA, Liegler TJ, Mammano F, et al. Impaired replication of protease inhibitor-resistant HIV-1 in human thymus. *Nat Med* 2001; 7:712-8.
74. Philpott S, Weiser B, Anastos K, et al. Preferential suppression of CXCR4-specific strains of HIV-1 by antiviral therapy. *J Clin Invest* 2001; 107:431-8.
75. Lane HC, Masur H, Edgar LC, et al. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1983; 309:453-8.
76. Valdez H and Lederman MM. Cytokines and cytokine therapies in HIV infection. *AIDS Clin Rev* 1997; 187–228.
77. Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, et al. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med* 1999; 5:83-9.
78. Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, et al. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in

- patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 2000; 95:249-55.
79. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999; 179:859-70.
 80. Sankaran S, Guadalupe M, Reay E, et al. Gut mucosal T cell responses and gene expression correlate with protection against disease in long-term HIV-1-infected nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:9860-5.
 81. Brenchley JM, Price DA and Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 2006; 7:235-239.
 82. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006, 12:1365-71.
 83. Caradonna L, Amati L, Magrone T, et al. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res* 2000; 6:205-14.
 84. Zanchetta M, Anselmi A, Vendrame D, et al. Early therapy in HIV-1-infected children: effect on HIV-1 dynamics and HIV-1-specific immune response. *Antiviral Therapy* 2008; 13:47-55.
 85. Indraccolo S, Zamarchi R, Veronese ML, et al. Standardization of in vitro synthesis and detection of HIV-1-specific antibodies. *J Immunol Methods* 1993; 157:105-115.
 86. Propato A, Schiaffella E, Vicenzi E, et al. Spreading of HIV-specific CD8+ T-cell repertoire in long-term nonprogressors and its role in the control of viral load and disease activity. *Hum Immunol* 2001; 62:561-576.
 87. The European Collaborative Study. Age-related standards for T lymphocyte subsets based on uninfected children born to human immunodeficiency virus 1-infected women. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11:1018-1026.
 88. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*. 2003; 9:727-728.
 89. Kassutto S, Johnston MN, Rosenberg ES. Incomplete HIV type 1 antibody evolution and seroreversion in acutely infected individuals treated with early antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2005; 40:868-873.
 90. Borkowsky W, Zhan MX, Chen SH, et al. Correlation between HIV-Specific CD8 cell production of interferon- gamma and plasma levels of HIV RNA in perinatally infected pediatric populations. *J Infect Dis* 2004; 190:722-726.
 91. Fischer M, Joos B, Hirschel B, et al. Cellular viral rebound after cessation of potent antiretroviral therapy predicted by levels of multiply spliced HIV-1 RNA encoding nef. *J Infect Dis* 2004; 190:1979-1988.
 92. Jordan KA, Furlan SN, Gonzalez VD, et al. CD8 T cell effector maturation in HIV-1-infected children. *Virology* 2006; 347:117-26.
 93. Brenchley JM, Douek DC, Ambrozak DR, et al. Expansion of activated human naive T-cells precedes effector function. *Clin Exp Immunol* 2002; 130:432-40.
 94. Wang YM, Wang B, Dyer WB, et al. Evidence for predominance of CCR5-using HIV-1 strains during highly active antiretroviral therapy. *Curr HIV Res* 2007; 5:221-34.
 95. Ye P, Kirschner DE, Kourtis AP. The thymus during HIV disease: role in pathogenesis and in immune recovery. *Curr HIV Res* 2004; 2:177-83.
 96. Mammano F, Trouplin V, Zennou V, Clavel F. Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. *J Virol* 2000; 74:8524-31.
 97. Savarino A, Bottarel F, Malavasi F, Dianzani U. Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? *AIDS* 2000; 14:1079-89.
 98. Resino S, Seoane E, Gutierrez MD, et al. CD4+ T-cell immunodeficiency is more dependent on immune activation than viral load in HIV-infected children on highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42:269-76.

99. De Martino M, Rossi ME, Azzari C, et al. Different meaning of CD38 molecule expression on CD4+ and CD8+ cells of children perinatally infected with human immunodeficiency virus type 1 infection surviving longer than five years. *Pediatr Res* 1998; 43:752–8.
100. McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 2001; 410:974–9.
101. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 2002; 417:95–8.
102. Rosenblatt H, Stanley K, Song L, et al. Immunological response to highly active antiretroviral therapy in children with clinically stable HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005; 192:445–55.
103. Resino S, Navarro J, Bellón JM, et al. Naïve and memory CD4+ T cells and T cell activation markers in HIV-1 infected children on HAART. *Clin Exp Immunol* 2001; 125:266-73.
104. Resino S, Galan I, Bellon JM, et al. Characterizing the immune system after long-term undetectable viral load in HIV-1-infected children. *J Clin Immunol* 2003; 23:279–89.

9. RINGRAZIAMENTI

Al Prof. Vittorio Colizzi va un particolare ringraziamento per avermi dato l'opportunità di iniziare un percorso formativo per me così importante; per avermi sempre sostenuto, aiutato e spronato a migliorare; per aver svolto in maniera ineccepibile il suo ruolo di "supervisor". In tutti questi anni il Professore ed il suo gruppo di ricerca mi hanno insegnato non solo come apprendere ma mi hanno fatto anche capire il valore della condivisione della conoscenza permettendomi di poter crescere scientificamente ed umanamente.

Alla Prof.ssa Anita De Rossi va il ringraziamento per avermi accolto e dato l'opportunità di lavorare presso il suo laboratorio, per avermi consentito di migliorare la mia formazione scientifica e per avermi insegnato molto facendomi così maturare professionalmente.

Ringrazio di cuore i miei colleghi/amici che mi sono sempre stati vicini in tutti questi anni e che mi hanno aiutato, consigliato e molte volte "sopportato". Grazie Elisabetta, Angelo e Graziana, con voi ho potuto condividere i miei piccoli successi, delusioni e spesso tante giornate splendide; Carla e Giulia che mi avete insegnato tanto ed avuto anche tanta pazienza.

Un pensiero va anche ai "nuovi" colleghi padovani come Marisa, che mi ha dato una mano ad inserirmi nel laboratorio ed ha fornito un fondamentale contributo nello svolgimento di questa ricerca ed Elisabetta con cui mi sono subito trovata bene.

10. PUBBLICAZIONI

Amicosante M., Andreoni A., Anselmi A., et al. "Development of a post-exposure paediatric anti-HIV/AIDS vaccine based on the combined synthetic/recombinant HIV peptides and BCG for boosting innate and acquired immunity". North-South transfer in biotechnology of tuberculosis and AIDS. Selected Papers. Edited by: Vittorio Colizzi, Luc Montagnier. Ottobre 2004.

Anselmi A, Vendrame D, Rampon O, et al. Immune reconstitution in human immunodeficiency virus type 1-infected children with different virological responses to anti-retroviral therapy. Clin Exp Immunol 2007; 150: 442–450.

Zanchetta M, Anselmi A, Vendrame D, et al. Early therapy in HIV-1-infected children: effect on HIV-1 dynamics and HIV-1-specific immune response. Antiviral Therapy 2008; 13:47-55.

Amicosante M., Anselmi A., Castelli G., et al. "New concepts in vaccine development in AIDS and Tuberculosis". II National congress of immunology with international participation. Sofia, 30 Maggio-1 Giugno, 2003 (*abstract*).

Anselmi A. "Analysis of the immune response to selected HIV peptides in seropositive subjects (mother and child) from Ivory Coast". UNESCO Advanced course "Environment and Immunology: from allergic to infectious diseases in Eastern Europe". University of Rome, Roma 22-26 Settembre, 2004 (*abstract*).

Anselmi A, Montesano C, Martino AM, et al. "Caratterizzazione della risposta immunitaria HIV-specifica e valutazione dei parametri dell'ospite associati alla progressione dell'infezione in una popolazione pediatrica libica infettata con un ceppo monofiletico di HIV". 13° Incontro di Informazione Scientifica OBG. Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma 13-14 luglio 2005 (*abstract*).

Anselmi A, Vendrame D, Cabbia M, et al. "Immunological reconstitution in HIV-1-infected children with different virological response to highly active antiretroviral therapy".

XX Congresso Nazionale AIDS e Sindromi correlate. Roma, 28-30 Novembre 2006
(*abstract*).

Vendrame D, Anselmi A, Cabbia M, et al. "Predictors of virologic response to antiretroviral therapy and impact of drug-resistance on CD4 T-cell repopulation". XX Congresso Nazionale AIDS e Sindromi correlate. Roma, 28-30 Novembre 2006 (*abstract*).

Zanchetta M, Anselmi A., Vendrame D., et al. "Predictors of Virologic Response to Antiretroviral Therapy (ART) and Characterization of Immune repopulation in HIV-1-Infected Children with different virologic response to ART". 14TH Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection. Los Angeles 25-28 February 2007 (*abstract*).

Development of a post-exposure paediatric anti-hiv/aids vaccine based on the combined synthetic/recombinant hiv peptides and bcg for boosting innate and acquired immunity

M. Amicosante¹, M. Andreoni¹, A. Anselmi¹, G. Castelli¹, A. Ciaramella¹, V. Colizzi¹, R. D'Arrigo¹, G. Di Giorgio¹, L. Ercoli¹, M. Fraziano¹, S. K. Garg¹, P. Marchione¹, M. Mattei¹, G. Palmieri¹, F. Perno¹, C. Saltini¹, M. Santucci¹, T. Summerska¹, P. Rossi¹, S. Vendetti¹, G. Cappelli², A. Cavone², M. Grassi², F. Mariani², M. Mignone², G. Perretta², R. Casetti², D. Horejsh³, A. Martino³, F. Martini³, C. Montesano³, C. Gioia³, F. Poccia³, L. Pucillo³, A. Sacchi³, C. T. Bonanno⁴, F. Dieli⁴, C. Di Sano⁴, A. Salerno⁴, C. Cairo⁵, R. Gallo⁵, R. Redfield⁵, D. Pauza⁵, H. Chenal⁶, L. Montagnier⁶, R. Olivier⁶, T. Toni⁶, L. Maule⁷, J. Simpure⁸

1. Introduction

In vertical transmission of HIV, the majority of infections occur at the moment of delivery or during breast-feeding. The introduction of short course antiretroviral therapy to mother and child and the artificial nutrition has diminished the rate of infection in the west countries (Europe and North America), but not in Africa where breast-feeding contributes to high rates of infant infection.

Ivory Coast, Burkina Faso and Cameroon represent the countries of West and Central Africa with higher HIV seropositivity, in which the average of 10-16% of pregnant women are infected by HIV-1, with high incidence of other sexually transmitted diseases and tuberculosis. The WHO and the Italian Co-operation has launched in these countries a prevention campaign (see the specific article of the Technical Report) involving three district hospitals (Alepe and Bonoua in Ivory Coast, and Ougadougou in Burkina Faso) to control the mother-to-child transmission of HIV.

This campaign is based on the HIV screening of pregnant women for identification of seropositivity, short course of antiretroviral treatment with Nevirapine of mothers and their infants, and subsequent control of viral load, immune status and seropositivity of children.

The present research project, supported by the UNÉSCO Program "Families First

¹ University of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy

² Institute of Molecular Medicine, CNR, Rome, Italy

³ National Institute for Infectious Diseases "L. Spallanzani", Rome, Italy

⁴ Department of Biomedicine, University of Palermo, Palermo, Italy

⁵ Institute of Human Virology, University of Maryland, Baltimore, USA

⁶ World Foundation for AIDS Research and Prevention & CIRBA, Abidjan, Ivory Coast

⁷ Alepe Hospital & Cesda Alepe, Ivory Coast

⁸ St. Camille Medical Centre, Ougadougou, Burkina Faso

Africa", aims to develop a Post-exposure Paediatric anti-HIV/AIDS Vaccine based on a cocktail of HIV synthetic and recombinant peptides (recombinant env from A/G clade, and peptides from gag, tat, nef, vpr, and vpu). HIV peptides have been selected by the "reverse immunogenetics" approach by using HLA-peptide-binding motifs and considering the HIV A/G clade variability for each selected epitopes. Recombinant and synthetic peptides are administered together with the standard BCG (Bacillus Calmette-Guerin) vaccine against tuberculosis within 1 week after the birth.

2. Rationale of the Project

The more interesting model for post-exposure infection is the vertical transmission of HIV from seropositive mother to children, where the majority of infections occurs at the moment of delivery (60-70 %) or during breast feeding (20-30%) and only a minority in utero (<10%). In several part of Africa more than 10% of pregnant women are infected by HIV-1, with a high rate (30-40%) of HIV transmission to their children at the moment of delivery or during breast-feeding.

In Subsharian Africa, the frequency of paediatric AIDS is high, and progression from asymptomatic or symptomatic HIV disease to death is rapid in children (1). The introduction of short course antiretroviral therapy to mother and child and the artificial nutrition has diminished the rate of infection in the west countries (Europe and North America). But not in Africa, where breast-feeding contributes to high rates of infant infection and thousands of children are infected by their mothers every day. Little information is available for phase I/II clinical trial in children born to seropositive mothers regarding anti-HIV vaccination. The Paediatric AIDS Clinical Trial Group, protocol 230, has recently performed in USA a randomised, placebo-controlled, multicenter trial comparing different doses of two recombinant HIV-1 envelope vaccines (Genentech/VaxGen rgp120 and Chiron/Biocine rgp120) in neonates born to HIV-1 infected. Vaccines were safe and well tolerated in neonates, and there was no evidence of accelerated immune decline in HIV-infected infants. Vaccine recipients developed antigen-specific lymphoproliferative responses, and immunisations were maintained for more than two years. However, this study was not designed to determine vaccine efficacy. In fact, efficacy of candidate vaccines in neonates would require study of cohorts in which transmission remains high and in which transmission via breast-feeding continues to be a significant problem.

In humans, the acellular pertussis vaccine is immunogenic in children with perinatal HIV-1 infection but early vaccination is more effective, taking advantage of still adequate CD4-positive cell numbers (2).

Animal studies have confirmed that HIV vaccines are both well tolerated and immunogenic within weeks of the initial vaccination in immunologically immature infant chimpanzees (3).

There are several parameters of the vaccine-induced immune response that will determine its ability to protect the host from infection or diseases including specificity, functional properties, magnitude, and compartmentalisation. However, the most critical factor is timing. The timing of the immune response with respect to initial virus infection and spread is particularly important in the case of HIV-1 infection.

One reason for this is that the longer HIV replicates in the host, the more diverse variants evolve that allow escape for subsequent immune responses. In addition, once HIV resides in the extracellular space of lymph node germinal centres and in latently infected cellular reservoirs, and is sequestered in the central nervous system and other sites that are rela-

tively protected from immune responses, it is unlikely that it can be fully eliminated from the host.

Therefore, the success of vaccination may hinge upon altering events that occur in the early hours following HIV exposure. Thus, considering the timing of vaccination the most relevant parameter for the induction of a protective immune response, children born to seropositive mothers will be the ideal cohort candidates for the HIV vaccine. On the other hand, any global strategy for controlling the HIV epidemic is likely to rely heavily on immunisation of infants and children.

Neonatal immune responses, both in humans and in animals are based mainly on molecular and cellular mechanisms of innate immunity which play a major role not only as first defence barrier but also for the instruction of the acquired immunity, i.e. the specific recognition of pathogens. Innate immune cells recognise molecular structures of pathogens, which represent danger signals.

For instance, the evolutionary conserved Toll-like receptors are expressed on monocytes and dendritic cells which are then able to recognise different molecules (DNA, LPS, etc.) of microbial pathogens.

The interaction between innate immunity and pathogens is carried out not only by monocytes (4, 5, 6) and dendritic cells but also by CD1 $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells recognising non-protein molecules. All these cells play a complex role in the activation of T and B cells specific for microbial proteins and peptides, which represent the memory of the immune response, built by children in few months after the birth. Thus, this Vaccine is designed to be able to activate both innate and acquired T and B cell immunity.

3. Innate and Acquired Immunity against HIV

In the last years an increasing bulk of studies have suggested that innate or, more widely, non-specific mechanisms may play a crucial role in protection against HIV infection (7,8). Up-regulation of β -chemokines, increased secretion of CD8 cell anti viral factor or $\gamma\delta$ T cell activity have been associated to protection against SIV or SHIV infection in vaccinated macaques (9,10). Recently, inhibition of mother-to-child transmission of HIV-1 was associated to up regulation of Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) in placenta of non transmitting HIV-1 infected mothers (11).

Clues in favour of non-specific mechanisms of protection against HIV infection come also from studies on exposed seronegative individuals. Increased production of CD8 cell anti viral factor and β -chemokines have been found in exposed seronegative individuals compared to controls (12,13).

Moreover, number of studies showed that non-specific activation of different compartments of the innate immunity, such as NK cells, $\gamma\delta$ T cells or macrophages, can inhibit HIV-1 replication (14,15,16,17,18,19,20). All these data suggest that innate responses have a direct impact on HIV infection or may be a useful complement to specific immune responses in vaccination.

We have recently observed that two subsets of $V\gamma 2V\delta 2^+$ T cells could be identified on the basis of CD27 expression in immunocompetent adults, showing that functionally differentiated $\gamma\delta$ T cells have lost CD27 expression (21). Differently, the CD27⁻ CD45RA⁻ $V\gamma 2V\delta 2^+$ T cell subset is absent in cord-blood cells from healthy new-borns and lacking in the peripheral blood from HIV-infected patients. These observations indicate that monitoring and boosting $\gamma\delta$ T cell effectors could be clinically relevant in new-born at risk for HIV vertical transmission.

It has been previously reported that synthetic peptides containing selected HIV-specific

B and T cell epitopes can induce HIV neutralising antibodies and specific T CD8 cytotoxic and CD4 helper cells in humans and produce a certain degree of protection in animal models (22). However, CTL response in HIV infection, although strong and broad distributed against different HIV-proteins, fails to control the infection completely (23).

In this context, a role seems to be played by CD4+ T cells in "generating" an environment that maintained the anti-HIV specific CD8 response efficient not only in terms of number of specific cells but particularly in terms of efficiency in killing infected cells by granzymes. Consequently, an effective protection should be induced only stimulating both cell types in order to allow them to kill efficiently the HIV-infected cells in a time shorter than the viral replication and budding.

In particular, T cell epitopes used in this project have been selected by the "reverse immunogenetics" approach with three distinct criteria:

- *selection of the cross-clade conserved regions of different HIV-proteins involved in CTL and helper response against HIV with particular attention to proteins involved in acute infection;*
- *identification of the promiscuous epitopes in the selected areas by using peptide-binding motifs analysis for HLA class I and II;*
- *selection of the minimum number of epitopes for each HIV protein that allow the response on any HLA haplotype and any virus clade.*

HIV gag, tat, nef, vpr, vpu sequences identified as containing a large numbers of HLA peptide-binding motifs were analysed by different algorithms (24,25). In particular, SYF-PEITHI (<http://www.syfpeithi.de>) (26) and BIMAS (http://www.bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind) (27) databases has been used for prediction and scoring of each putative epitopes for all available HLA-class I alleles.

A further analysis was made by PAPROC (<http://www.paproc.de>) (28) in order to identify the most probable area of proteasome processing to design properly overlapping peptides containing more than one binding profile.

Regarding B cell epitopes, neutralising anti-HIV antibody production could be induced after vaccination but, to be protective, production should occur at both systemic and mucosal level. In particular, as one of the possible risk of HIV transmission in new-born occurs at the oropharyngeal mucosa level through breast feeding (29), the possibility to increase mucosal immune responses, particularly IgA-mediated, could represent an important mechanisms of prevention from HIV transmission (30).

Thus, this project will focus not only to neutralising gp120 epitopes (31, 32), but also to immunogenic peptide derived from gp41, which is involved in the interaction between HIV-1 and CD4 negative epithelial cells and in transcytosis of HIV in the mucosa (33).

The use of a mixture of HIV peptides (polyepitopic immunogen) has been performed in primates and in human, showing the possibility to induce immune responses that were greater and more cross-reactive than those induced by a single peptide (34, 35,36,14).

The amino acid sequences of peptides encompassing the T and B cell HIV epitopes (recombinant env from A/G clade, and peptides from gag, tat, nef, vpr, vpu) which are used in this project are reported in Table 1.

4. BCG as adjuvant for HIV paediatric vaccine

Due to the epidemiology of tuberculosis in Africa, African children are routinely vaccinated with BCG within the first week of their life. Thousand of BCG vaccinations performed in children infected with HIV at the birth indicate that this kind of vaccination is safe in HIV-infected host and dissemination of BCG is a rare event (37,38).

The design of a protective vaccine based on HIV synthetic/recombinant peptides is limited by their poor immunogenicity. However, synthetic V3 loop peptides covalently bound to PPD (purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*) as carrier protein have been shown to exhibit over time a uniform increase in neutralising antibodies when injected intradermally in PPD skin test-positive subjects (14).

BCG (live Calmett-Guerin strain of *Mycobacterium bovis*) has been shown to possess a strong systemic and mucosal adjuvant activity, which can induce both humoral and cell-mediated immune response (39) Fig.1.

In particular, viable BCG has been described inducing the signalling via both Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) (40) and causing the maturation of immature DC into fully activated mature DC (41). Moreover, infection of DC with BCG facilitates secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-12, TNF, IFN, etc.) and up regulates CD40, CD80, CD83, CD86, and MHC class I molecules. (42).

Moreover, DC exhibit potent antigen presenting ability through uptake of BCG, and this activity can be used on soluble antigens other than BCG itself. (26). Finally, conditioned DC can be a temporal bridge between CD4 TG helper and CD8 cytotoxic T cells (43).

BCG vaccination in adults (44,45) has been reported to expand and activate cells carrying the V γ 2V δ 2 T cell receptor, a class of cells expressing strong innate anti viral activities, as above described. Recent experiments performed in Ivory Coast and in Rome have shown that V γ 2V δ 2 T cells from cord blood can be expanded by BCG in vitro, suggesting another possible role of BCG vaccination in the enhancement of natural immunity in the first days of life (13).

Another class of T lymphocytes, which has been described to be activated by mycobacterial products such as lipid and glycolipids, are the CD1-restricted T cells (46,47). Glycolipid antigens derived from *M. tuberculosis* stimulate CD1-restricted T lymphocytes (48), and cells reactive to glycolipid have been found in patients with tuberculosis (49).

The CD1-restricted T lymphocytes as well as the NKT population, which represents a subtype of these cells, play an important role in the activation of immune response, since are able to produce high levels of both IL-4 and IFN γ upon activation (30, 50).

Furthermore, it has been described that the CD1-restricted T lymphocytes have a cytotoxic effect on in vitro infected monocytes with *M. tuberculosis*, leading to the killing of the bacteria (51).

The activation of these cells by viable BCG may play an additional role in the activation of the immune response to HIV. Recent studies on the influence of BCG on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination have shown that BCG induces a potent Th1 response both to mycobacterial and to unrelated antigens. However, administration of BCG at the time of priming (at birth) markedly increases the cellular and antibody responses to the hepatitis B vaccination, but only limited effect on the tetanus and diphtheria toxoids which are administered at two months of age (52).

Moreover, BCG has been also described to induce a potent B cell response with production of IgG and IgA, also against unrelated vaccine antigens administered mucosally, as shown by the increased antibody response to oral polio vaccine (36). As one of the possible risk of HIV transmission in new-born occurs at the oropharyngeal mucosa level through

breast feeding (19), the possibility to increase mucosal immune responses, particularly IgA-mediated, could represent an important mechanisms of prevention from HIV transmission (20). Finally, it has been found that recombinant BCG constructs expressing simian immunodeficiency virus (SIV) Gag, Pol, Env, and Nef proteins are immunogenic in mice and rhesus macaques (53,54,55). It is of interest that such vaccine works also when administered intranasally in Th1 and Th2 deficient conditions (56).

However, although a phase 1 clinical trial is under consideration in South Africa, the safety aspects linked to the use of live recombinant bacteria will limit and delay the usage of this kind of vaccine in the next years. Thus, the Paediatric Vaccine that we are developing is designed to be available immediately as a conventional vaccine that could be administered together with the standard vaccination in children. Figure 1 illustrates the concept of using BCG to stimulate innate and acquired immunity against HIV.

5. The distinct phases of the HIV Paediatric Vaccine

The Vaccine Project is structured in the Four different Sections. The Section I report the *ex vivo* preliminary studies performed in Rome and in Ivory Coast. In particular, this Section presents data on the computer-based selection of HLA-haplotype and HIV-clade independent CTL epitopes (Tab.1) and the *in vitro* analysis of Gag- and Nef-specific T cell reactivity of ivorian HIV-seropositive individuals (See also the chapter of the present Technical Report).

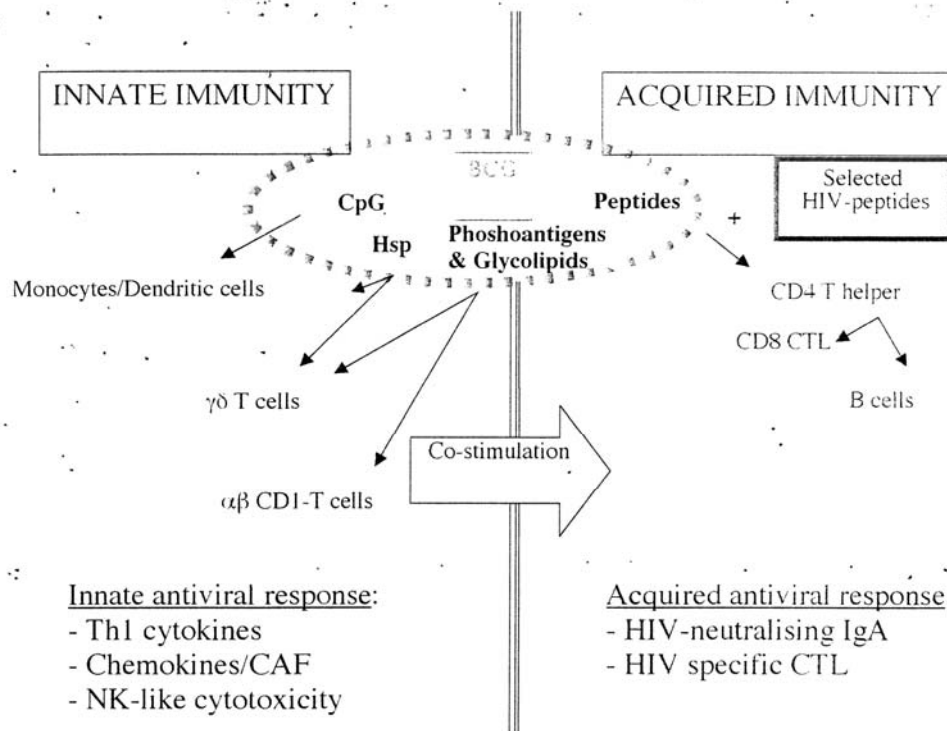


Figure 1.

Finally, **Section I** reports the functional studies in HIV-infected patients and of children born from HIV seropositive mothers, with particular references to the differentiation and maturation of dendritic cells, and T cells of the innate immunity (NK cells and gd T cells). **Section II** illustrates the pre-clinical part of this paediatric anti-HIV/AIDS vaccine that is in progress in mice and monkeys and is based on the administration of synthetic/recombinant peptides from HIV proteins together with BCG. This experimental pre-clinical study is divided in two phases, regarding respectively the analyses of the toxic effects (phase I in mouse and monkeys), and the boosting innate and acquired immunity by the combined vaccine (phase II in monkeys).

The pre-clinical part equivalent to phase III will be performed in an infant model of *Macaca fascicularis* challenged with SIV/HIV.

Section III describes the planning of preliminary vaccine trial in adult voluntaries (Italy and USA) to test the toxicity, and the multicentre, phase II, randomised, and I placebo-controlled vaccine studies planned in Ivory Coast, Burkina Faso and Cameroon.

The aim is to evaluate in vaccinated children born to seropositive mothers the possible toxic effect of HIV peptides, any interference of HIV peptides with the anti-mycobacterium reactivity induced by BCG, and the induction of strong anti-HIV innate and acquired immunity.

Finally, **Section IV** describes the experimental approach for the development of the next generation of this Paediatric Vaccine based on the use of recombinant BCG expressing HIV epitopes.

6. The Partnership

The Paediatric Vaccine Project is performed in the context of the UNESCO Program "Families First Africa", financially supported by the Italian Government. The Program and the Vaccine Project are a formal partnership between the University of Rome "Tor Vergata", the World Foundation for Research and Prevention against AIDS (UNESCO, Paris), and the Institute of Human Virology of the University of Maryland (Baltimore, USA).

The University of Rome "Tor Vergata" (Italy), and its UNESCO Interdisciplinary Chair

Table 1. List of HIV-1 (A/G clade) peptides from gag, nef, tat, vpu, vpr protein sequences used for the post-exposure paediatric vaccine UNESCO//PV-HIV/P-BCG/IAI

1. GAG1 PGGKKKYRLKHLVWA	14. NEF4 NYTPGPGIRYPLT
2. GAG2 KKYRLKHLVWASREL	15. NEF5 GIRYPLTFGWCFKLPV
3. GAG3 RELERFAVNPGLLET	16. NEF6 FKLVPVEPEKIEE
4. GAG4 EELRSLYNTVATLYC	17. Tat1 NCYCKKCCYHCQVCF
5. GAG5 SLYNTVATLYCVHQR	18. Tat2 CCYHCQVCFLTKGLG
6. GAG6 SPEVIPMFSALSEGA	19. Tat3 VCFLTKGLGISYGRK
7. GAG7 QDLNMMMLNIVGGHQA	20. Tat4 LGISYGRKKRRQRRG
8. GAG8 MMLNIVGGHQAAMQM	21. VPU1 SLIAAIVGLVAFIA
9. GAG9 GDIYKRWILGLNKI	22. VPU2 GLVAFIAAIVVWTI
10. GAG10 IVRMYSPPSILDIKQ	23. VPU3 EYRKIRKQKKIDKLL
11. NEF1 DLVYHTQGYFP	24. VPR1 KHEAVRHFPRLHGL
12. NEF2 WVYHTQGYFPDWQ	25. VPR2 DTWEGVAIIR ILQQLL
13. NEF3 FPDWQNYTPGPGIRY	

Partner	Name	Institute	Functions
•1	V. Colizzi M. Amicosante M. Andreoni, L. Ercoli C. F. Perno P. Rossi, G. Castelli M. Fraziano, M. Mattei, T. Summerska	University of Rome Tor Vergata	- Co-ordination - Selection HIV peptides - Phase I Adult volunteers - HIV clade sequencing - paediatric clinical data analysis - BCG 19kD studies - Animal studies
	F. Mariani, M. Grassi G. Cappelli G. Perretta	National Research Council	- Recombinant HIV-BCG - African study co-ordination - Monkey study
	A. Salerno, F. Dieli	University of Palermo	- HLA typing
•2	L. Montagnier H. Chenal T. Toni	World Foundation AIDS Research CIRBA, Abidjan, Ivory Coast	- Trial procedures - Virological & immunological assay - HIV clade sequencing
•3	R. Gallo, R. Redfield C.D. Pauza, C. Cairo	University of Maryland, Baltimore	- Trial procedures, gp120/CD4 - TCR repertoire - Monkey studies
•4	L. Manue J. Sempore	Alepe Hospital, Ivory Coast St. Camille Hospital, Burkina Faso	- children care - children care

in Biotechnology, is the reference institution for the planning of the study, animal experimentation's, the set up and monitoring of technologies used to follow the vaccinations and for the analysis of immunological and virological data. Moreover, the UNESCO Chair is the focal point for the Italian Co-operation in the context of the WHO/Italy Programme on Prevention of Vertical transmission of HIV infection in Ivory Coast and Burkina Faso. Moreover, the collaboration with the University of Palermo will allow to acquired detailed information's on the HLA haplotypes of vaccinated children. Finally, the long-lasting collaboration between the University and the Institute of Molecular Medicine of the National Research Council at the Tor Vergata Science Park is focusing at the moment on the construction of an efficient recombinant BCG expressing HIV peptides with immunogenic characteristics.

The Institute of Human Virology, (IHV) Baltimore, is the institution responsible for the identification and set up of the vaccine trial procedures. Moreover, the IHV is responsible for the production of recombinant protein(s) used in this study, for the immunological TCR studies and for the set up of SIV/HIV challenge of infant monkeys.

In West Africa, the Centre Integree des Recherches Bioclinique d'Abidjan (CIRBA) is the reference centre for the immunological and virological laboratory tests performed with children enrolled in this study. The clinical staff of the Alepe's Hospital (Ivory Coast) and of the St. Camille Hospital (Ougadougou, Burkina Faso) is responsible for vaccination, anti-retroviral treatment and for clinical and laboratory follow-up.

This Vaccine Project is financially sponsored by the Italian Foreign Office (Italian Co-operation) as fund-in-trust of UNESCO. UNESCO-ROSTE (Regional Bureau for Science and Technology in Europe), the Italian National Commission of UNESCO, the Italian National Research Council (CNR) and the Istituto Superiore di Sanità (ISS) are also supporting in different ways the Vaccine Project.

The institutional partners, the principal scientists involved, and the role of each Institutions are listed in the following table.

References

1. TAHA TE., GRAHAM SM., KUMWENDA NI., BROADHEAD RL., HOOVER DR., MARKAKIS D., VAN DER HOEVEN L., LIOMBA GN., CHIPHANGWI JD., MIOTTI PG., *Morbidity among human immunodeficiency virus-1-infected and uninfected African children.* Pediatrics, 2000, 106, E77.
2. DE MARTINO M., PODDA A., GALLI L., SINANGIL F., MANNELLI F., ROSSI ME., VIERUCCI A., *Acellular pertussis vaccine in children with perinatal human immunodeficiency virus-type 1 infection.* Vaccine, 1997, 15, 1235-8.
3. BAGARAZZI ML., BOYER JD., JAVADIAN MA., CHATTERGOON M., DANG K., KIM G., SHAH J., WANG B., WEINER DB., *Safety and immunogenicity of intramuscular and intravaginal delivery of HIV-1 DNA constructs to infant chimpanzees.* J. Med. Primatol. 1997, 26, 27-33.
4. CIARAMELLA A., MARTINO A., CICCONE R., COLIZZI V., FRAZIANO M., *Mycobacterial 19-kDa lipoprotein mediates Mycobacterium tuberculosis-induced apoptosis in monocytes/macrophages at early stages of infection.* Cell Death and Diff, 2000, 7, 1270-2.
5. CIARAMELLA A., CAVONE A., SANTUCCI M.B., AMICOSANTE M., MARTINO A., AURICCHIO G., PUCILLO L.P., COLIZZI V., FRAZIANO M., *Pro-inflammatory cytokines in the course of Mycobacterium tuberculosis-induced apoptosis in monocytes/macrophages.* J. Infect. Dis., 2002 Nov 1; 186(9):1277-82.
6. MARIANI F., GOLETTI D., CIARAMELLA A., MARTINO A., COLIZZI V., FRAZIANO M., *Macrophage response to Mycobacterium tuberculosis: relationships between activation and apoptosis.* Curr. Mol. Med., 2001; 1: 209-216
7. MANCINO G., PLACIDO R., BACH S., MARIANI F., MONTESANO C., ZEMBALA M., COLIZZI V. *Infection of human monocytes with Mycobacterium tuberculosis enhances human immunodeficiency virus type 1 replication and virus transmission to T cells.* J. Infect. Dis. 175, 1531-1535, 1997.
8. SANDUZZI A., FRAZIANO M., MARIANI F. *Monocytes/macrophages in HIV infection and tuberculosis.* J Biol Regul Homeost Agents, 2001; 15: 294-298.
9. HEENEY JL., TEEUWSEN VJ., VAN GILS M., BOGERS WM., DE GIULI MORGHEN C., RADAELLI A., BARNETT S., MOREIN B., AKERBLUM L., WANG Y., LEHNER T., DAVIS D., *Beta-chemokines and neutralizing antibody titers correlate with sterilizing immunity generated in HIV-1 vaccinated macaques.* Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95, 10803-8.
10. LANE BR., MARKOVITZ DM., WOODFORD NL., ROCHFORD R., STRIETER RM., COFFEY MJ., *TNF-alpha inhibits HIV-1 replication in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages by inducing the production of RANTES and decreasing C-C chemokine receptor 5 (CCR5) expression.* J Immunol, 1999 Oct 1; 163(7):3653-61.
11. PATTERSON BK., BEHBAHANI H., KABAT WJ., SULLIVAN Y., O'GORMAN MR., LANDAY A., FLENER Z., KHAN N., YOGEV R., ANDERSSON J., *Leukemia inhibitory factor inhibits HIV-1 replication and is upregulated in placentae from non-transmitting women.* J Clin Invest, 2001, 107, 287-94.
12. ZAGURY D., LACHGAR A., CHAMS V., FALL LS., BERNARD J., ZAGURY JF., BIZZINI B., GRINGERI A., SANTAGOSTINO E., RAPPAPORT J., FELDMAN M., O'BRIEN SJ., BURNY A., GALLO RC., *C-C chemokines, pivotal in protection against HIV type 1 infection.* Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95, 3857-61.
13. GARZINO-DEMO A., MOSS RB., MARGOLICK JB., CLEGHORN F., SILL A., BLATTNER WA., COCCHI F., CARLO DJ., DEVICO AL., GALLO RC., *Spontaneous and antigen-induced production of HIV-inhibitory beta-chemokines are associated with AIDS-free status.* Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96, 11986-91.
14. VERANI A., SCARLATTI G., COMAR M., TRESOLDI E., POLO S., GIACCA M., LUSSO P., SICCARDI AG., VERCELLI D., *C-C chemokines released by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells.* J Exp Med, 1997, 185, 805-16.

15. FRANCHIN G., ZYBARTH G., DAI WW., DUBROVSKY L., REILING N., SCHMIDTMAYEROVA H., BUKRINSKY M., SHERRY B., *Lipopolysaccharide inhibits HIV-1 infection of monocyte-derived macrophages through direct and sustained down-regulation of CC chemokine receptor 5*. J Immunol, 2000, 164, 2592-601.
16. NAIF HM., LI S., HO-SHON M., MATHIJS JM., WILLIAMSON P., CUNNINGHAM AL., *The state of maturation of monocytes into macrophages determines the effects of IL-4 and IL-13 on HIV replication*. J Immunol, 1997, 158, 501-11.
17. MALKOVSKY M., FISH P., MACKENZIE D., BARTZ S.R., RADTKE B.E., WALLACE M., MANNING J., COLIZZI V., PAUZA C.D. *Are gd T cells important for the elimination of virus-infected cells?* J. Med. Primatol., 1992, 21, 113-118.
18. POCCIA F., CIPRIANI B., VENDETTI S., COLIZZI V., POQUET Y., BATTISTINI L., LOPEZ-BOTET M., FOURNIE JJ., GOUGEON ML., *CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V gamma 9V delta 2 T lymphocytes*. J Immunol, 1997, 159, 6009-17.
19. CASETTI R., PERETTA G., COLIZZI V., POCCIA F. MATTEI M., *In vitro V9V2 T cell reactivity to phosphoantigens in non-human primates and influence of in vivo administration in Macaca fascicularis* (submitted).
20. POCCIA F., BATTISTINI L., CIPRIANI B., MANCINO G., MARTINI F., GOUGEON ML., COLIZZI V., *Phosphoantigen-reactive Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines*. J Infect Dis, 1999, 180, 858-61.
21. GIOIA C., AGRATI C., CASETTI R., CAIRO C., BORSELLINO G., BATTISTINI L., MANCINO G., GOLETTI D., COLIZZI V., PUCILLO LP., POCCIA F., *Lack of CD27-CD45RA-V gamma 9V delta 2+ T cell effectors in immunocompromised hosts and during active pulmonary tuberculosis*. J Immunol., 2002; 168(3): 1484-9.
22. RUBINSTEIN A., MIZRACHI Y., PETTOELLO-MANTOVANI M., LENZ J., LIU GQ., RUBINSTEIN Y., GOLDSTEIN H., YLST I., BURKE M., VARDINON N., SPIRER Z., CRYZ SJ JR., *Immunologic responses of HIV-1-infected study subjects to immunization with a mixture of peptide protein derivative-V3 loop peptide conjugates*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1999, 22, 467-76.
23. McMICHAEL AJ., SR. ROWLAND-JONES, *Cellular immune response to HIV*. Nature, 2001; 410: 980-7.
24. AMICOSANTE M., GIOIA C., MONTESANO C., CASETTI R., TOPINO S., D'OFFIZI G., CAPPELLI G., IPPOLITO G., COLIZZI V., POCCIA F., PUCILLO L.P., *Computer-designed of an HLA-haplotype and HIV-clade independent CTL assay for monitoring HIV-specific immunity* Molecular Med., 2002 8(12): 798-807.
25. BALZAROTTI V., COLIZZI V., MORANTE S. & PARISI V., *An algorithm for the identification of similar oligopeptides between amino acid sequences*. Cabios, 1993, 9, 93-100.
26. RAMMENSEE HS., BACHMANN J., EMMERICH NN, BACHOR OA, STEVANOVIC S., *SYPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. Immunogenetics, 1999, 50:213-219.
27. PARKER KC., BEDNAREK MA., COLIGAN JE., *Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains*. J Immunol 1994, 152:163-75.
28. NUSSBAUM AK., KUTTLER C., HADELER KP., RAMMENSEE HG., SCHILD H., *PAProC: a Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages available on the WWW*. Immunogenetics, 2001, 53:87-94.
29. CHERMANN J.C., *Sexual mother to child transmission of the human immunodeficiency virus type 1: a review*. Am. J. Reprod. Immunol., 1998; 40: 183.
30. BUKAWA H., SEKIGAWA K., HAMAJIMA K., FUKUSHIMA J., YAMADA Y., KIYONO H., OKUDA K., *Neutralization of HIV-1 by secretory IgA induced by oral immunization with a new macromolecular multicomponent peptide vaccine candidate*. Nat. Med. 1995; 1: 681.
31. LOMBARDI V., ROSSI P., ROMITI L., MATTEI M., MARIANI F., POCCIA F., COLIZZI V., *HIV gp120 epitope immunodominance in MRL/lpr mice*. AIDS Human Retrov., 1992, 6, 671-672.
32. LOMBARDI V., PLACIDO R., SCARLATTI G., ROMITI L., MATTEI M., MARIANI F., POCCIA F., ROSSI P. & V. COLIZZI, *Epitope specificity antibody dependent cellular cytotoxicity, and neutralizing activity of anti HIV-1 antibodies present in autoimmune MRL/lpr mice*. J. Infect. Dis. 167, 1267-1271, 1993.
33. ALFSEN A., INIGUEZ P., BOUGUYON E., BOMSEL M., *Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1*. J. Immunol. 2001; 166: 6257.
34. CAO J., MCNEVIN J., HOLTE S., FINK L., COREY L., McELRATH MJ., *Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon-secreting CD8+ T cells in primary HIV-1 infection*. J Virol., 2003 Jun; 77(12): 6867-78.
35. HAYNES BF, TORRES JV, LANGLOIS A.J. ET AL., *Induction of HIVMN neutralizing antibodies in primates using a prime-boost regimen of hybrid synthetic gp120 envelope peptides*. J.Immunol. 1993, 151, 1646.
36. COEFFIER E., EXCLER JL., KIENY M.P., ET AL., *Restricted specificity of anti-V3 antibodies induced in human by HIV candidate vaccines*. AIDS Res. Human Retrov., 1997, 13, 1471.
37. THAITHUMYANON P., THISYAKORN U., PUNNAHITANANDA S., PRAISUWANNA P., RUXRUNGTHAM K., *Safety and immunogenicity of Bacillus Calmette-Guerin vaccine in children born to HIV-1 infected women*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2000, 31, 482-6.
38. GUERIN N., TEULIERES L., NOBA A., SCHLUMBERGER M., BREGERE P., CHAUVIN P., *Comparison of the safety and*

immunogenicity of the liophilized merieux seed and the world health organization working reference BCG *va cines* in school-aged children in Senegal. *Vaccine*, 1999, 17: 105.

39. HONDA M., MATSUI K., NAKASONE T., OKAMOTO Y., YOSHIZAKI H., KITAMURA K., SUGIURA W., WATANABE K., FUKUSHIMA Y., HAGA S., ET AL. *Protective immune responses induced by secretion of a chimeric soluble protein from a recombinant Mycobacterium bovis BCG vector candidate vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in small animals*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 10693.

40. BRIGHTBILL HD., LIBRATY DH., KRUTZIK SR., YANG RB., BELISLE JT., BLEHARSKI JR., MAITLAND M., NORGARD MV., PLEVY SE., SMALE ST., BRENNAN PJ., BLOOM BR., GODOWSKI PJ., MODLIN RL., *Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors*. *Science*, 1999, 285, 732-6.

41. TSUJI S., MATSUMOTO M., TAKEUCHI O., AKIRA S., AZUMA I., HAYASHI A., TOYOSHIMA K., SEYA T., *Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors*. *Infect Immun*, 2000, 68, 6883-90.

42. THURNHER M., RAMONER R., GASTL G., RADMAYR C., BOCK G., HEROLD M., KLOCKER H., BARTSCH G., *Bacillus Calmette-Guerin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells*. *Int J Cancer*, 1997, 70,128-34.

43. RIDGE J.P., DI ROSA F. & MATZINGER P., *A conditioned dendritic cells can be a temporary bridge between a CD4 T-helper and a T-killer cell*. *Nature*, 393, 474, 1988.

44. HOFT D.F., BROWN R.M., ROODMAN S.T., *Bacille Calmette-Guerin vaccination enhances human gd T cell responsiveness to mycobacteria suggestive of a memory-like phenotype*. *J. Immunol.*, 1998, 61, 1045.

45. WANG L., KAMATH A., DAS H., LI L., BUKOWSKI JF., *Antibacterial effect of human Vgamma2Vdelta2 T cells in vivo*. *J Clin Invest*, 2001, 108, 1349-57.

46. PORCELLI SA., MODLIN RL., *The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids*. *Annu Rev Immunol.*, 1999; 17:297-329.

47. DE LIBERO G., DONDA A., MORI L., MANOLOVA V., SHAMSHIEV A., *Immunity to glycolipid antigens in microbial infections*. *J Biol Regul Homeost Agents.*, 2001, 15, 249-56.

48. PORCELLI S., MORITA CT., BRENNER MB., *CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen*. *Nature*. 1992, 360, 593-7.

49. MOODY D.B., ULRICHS T., MÜHLECKER W., YOUNG D. C., GURCHA S. S., GRANİ E., ROSAT J. P., BRENNER M. B., COSTELLO C. E., BESRA G. S. AND PORCELLI S. A., *CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in Mycobacterium tuberculosis infection*. *Nature* 2000 404: 884.

50. SHAMSHIEV A., DONDA A., CARENA I., MORI L., KAPPOS L., DE LIBERO G., *Self glycolipids as T-cell autoantigens*. *Eur J Immunol.*, 1999, 29, 1667-75.

51. STENGER S., MAZZACCARO RJ., UYEMURA K., CHO S., BARNES PF., ROSAT JP., SETTE A., BRENNER MB., PORCELLI SA., BLOOM BR., MODLIN RL., *Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection*. *Science*, 1997, 276, 1684-7.

52. OTA M.O., VEKEMANS J., SHELGE-HAUPTER S.E., FIELDING K., SANNEH M., KIDD M., NEWPORT M.J., AABY P., WHITTLE H., LAMBERT P.H., MCADAM K.P., SIEGRIST C.A., *Marchant A. Influence of Mycobacterium bovis Bacillus calmette-Guerin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination*. *J. Immunol.*, 2002, 168, 919-925.

53. WINTER N., LAGRANDERIE M., GANGLOFF S., LECLERC C., GHEORGHU M., GICQUEL B., *Recombinant BCG strains expressing the SIVmac251nef gene induce proliferative and CTL responses against nef synthetic peptides in mice*. *Vaccine* 1995, 5, 471-8.

54. LAGRANDERIE M., WINTER N., BAŁAZUC AM., GICQUEL B., GHEORGHU M., *A cocktail of Mycobacterium bovis BCG recombinants expressing the SIV Nef, Env, and Gag antigens induces antibody and cytotoxic responses in mice vaccinated by different mucosal routes*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1998 Dec 20; 14(18): 1625-33.

55. LEUNG NJ., ALDOVINI A., YOUNG R., JARVIS MA., SMITH JM., MEYER D., ANDERSON DE., CARLOS MP., GARDNER MB., TORRES JV., *The kinetics of specific immune responses in rhesus monkeys inoculated with live recombinant BCG expressing SIV Gag, Pol, Env, and Nef proteins*. *Virology*, 2000 Mar 1;268(1):194-103.

56. HIROI T., GOTO H., SOMEYA K., YANAGITA M., HONDA M., YAMANAKA M., KIYONO H. *HIV mucosal vaccine: nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long term V3J1 peptide-specific neutralizing immunity in Th1 and Th2-deficient conditions*. *J. Immunol.*, 2001; 167, 5862-5867.

Immune reconstitution in human immunodeficiency virus type 1-infected children with different virological responses to anti-retroviral therapy

A. Anselmi,* D. Vendrame,*
O. Rampon,[†] C. Giaquinto,[†]
M. Zanchetta* and A. De Rossi*
**Department of Oncology and Surgical Sciences,
Oncology Section, Unit of Viral Oncology,
AIDS Reference Center, University of Padova,
IOV-IRCCS, and [†]Department of Pediatrics,
University of Padova, Padova, Italy*

Accepted for publication 4 September 2007
Correspondence: A. De Rossi, Department of
Oncology and Surgical Sciences, Oncology
Section, AIDS Reference Center,
Via Gattamelata 64, 35128 Padova, Italy.
E-mail: anita.derossi@unipd.it

Introduction

Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accounts for most paediatric HIV-1 infections. In the absence of anti-retroviral therapy, the establishment of the viral set point in infants occurs slowly, suggesting that induction of anti-viral immunity is not as rapid as in adults [1,2]. HIV-1 disease is characterized by chronic immune activation, and lymphocyte activation is a hallmark of disease progression [3]. Several studies suggest that, in addition to HIV-1 antigens, other viral and/or microbial antigens, proinflammatory cytokines and chemokines cause immune activation [4–6]. Increased translocation of luminal microbial products may also be involved [7]. Indeed, HIV-1 infection is localized predominantly to the gastrointestinal tract [8]; CD4⁺ T cell depletion and damage to the mucosal barrier lead to translocation of microbes and/or

Summary

Immune repopulation, despite virological failure, often occurs in children under highly active anti-retroviral therapy (HAART). The aim of this study was to analyse the characteristics of immune repopulation and activation in children with and without virological response to HAART. Fourteen human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected children with suppression of HIV-1 plasma viraemia (virological responders, VR) and 16 virological non-responders (VNR) to therapy were studied at baseline and after approximately 2 years of HAART. During therapy, CD4⁺ T cells increased in both groups, but were higher in the VR than in the VNR group. All CD4⁺ T cell subsets (naive, central memory, effector/memory and CD38⁺) increased significantly in VR children, while there was a significant increase only in naive cells in VNR children. Naive CD8⁺ T cells and T cell receptor rearrangement excision circles (TREC), an indicator of thymic output, increased in both VR and VNR children. Activated CD8⁺CD38⁺ T cells decreased in VR but remained high in VNR children. Levels of circulating lipopolysaccharide (LPS), an indicator of microbial translocation, further increased in VNR children. In conclusion, HAART induced an increase in naive cells in all children, regardless of their virological response. However, the persistence of viraemia resulted in an impaired expansion of memory CD4⁺ T cells susceptible to HIV-1 infection, and together with the microbial translocation sustained the persistence of a high level of immune activation.

Keywords: HAART, HIV-1-infected children, immune reconstitution, LPS, T cell activation

microbial products resulting in systemic immune activation [7].

The administration of highly active anti-retroviral therapy (HAART), which is usually a combination of protease and reverse transcriptase inhibitors, reduces HIV-1 load efficiently to undetectable levels and increases the number of circulating CD4⁺ T cells in children as well as adults [9,10]. Although HAART does not eradicate HIV-1, due to a persistent low level of viral replication and the longevity of latently infected cells, it allows for substantial recovery of immune function [11,12]. Immune reconstitution after HAART initiation is different in children. While, in the adult, it is a biphasic process with an initial rapid increase in memory CD4⁺ T cells followed by a slower and smaller increase in naive CD4⁺ T cells [13,14], in children immune repopulation involves mainly naive cells, due probably to more efficient thymopoiesis [15–18]. Furthermore, some children show a

discordant response to HAART characterized by a significant increase in CD4⁺ T cell counts, despite persistent detectable viraemia [15,16,19–22]. Although the mechanisms of this discordant response to HAART have not been elucidated fully, it has been suggested that thymic output [15,16,19,23] and an impaired replicative capacity of drug-resistant viruses [20,24,25] might be involved.

How different CD4⁺ T cell subsets contribute to immune reconstitution and influence immune activation in virological responder and non-responder children remains to be clarified. The aim of this study was to analyse the characteristics of immune reconstitution and the status of immune activation in children with different virological responses to therapy.

Materials and methods

Patients

The study cohort consisted of 30 vertically HIV-1-infected children who were treated at the Pediatric Department of Padova University. The inclusion criterion was their response to HAART: 14 virological responder (VR) children had long-term viral load (VL) suppression (VL \leq 400 copies/ml) and 16 virological non-responder (VNR) children had persistently detectable VL (VL > 400 copies/ml). All children were naive for protease inhibitor (PI) at HAART initiation. The HAART regimen consisted of a triple-drug combination, including two reverse transcriptase inhibitors (zidovudine, lamivudine, stavudine or nevirapine) and one protease inhibitor (nelfinavir, indinavir or ritonavir). Four VNR children enrolled in this study maintained a detectable VL despite changes in reverse transcriptase inhibitors. CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts and plasma HIV-1 RNA levels were followed over time. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from peripheral blood by centrifugation on Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) gradient and then cryopreserved until use. Seventeen age-matched uninfected children, all born to HIV-1-seropositive mothers, were also analysed. The study was approved by the Institutional Ethical Committee; informed consent was obtained for patients and controls from parents or legal guardians.

Flow cytometry quantification of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subpopulations

T lymphocyte subpopulations were stained for four-colour flow cytometry using the following labelled monoclonal antibodies (mAbs): anti-CD3 [fluorescein isothiocyanate (FITC)], anti-CD4 [peridinin chlorophyll protein (PerCP)], anti-CD8 (PerCP), anti-CD27 [phycoerythrin (PE)], anti-CD45RA [allophycocyanin (APC)] and anti-CD38 (PE). Appropriate isotypic controls (mouse IgG1-PE and mouse IgG2b-APC) were used to evaluate non-specific staining. mAbs were obtained from Becton-Dickinson (Becton-

Dickinson Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Acquisition was performed in a cytometer (FACSCalibur; Becton-Dickinson) cytometer using the CELLQuest Software (Becton-Dickinson). A total of 50 000 events were collected in the lymphocyte gate using morphological parameters (forward- and side-scatter). The percentage of CD45RA⁺, CD27⁺ and CD38⁺ cells was calculated within the CD3⁺CD4⁺ or CD3⁺CD8⁺ gate. The absolute cell count of different subsets was calculated by multiplying the percentage value by the total number of CD4⁺ or CD8⁺ T cells. CD45RA and CD27 expression was used to identify CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets as follows: CD45RA⁺CD27⁺ (naive), CD45RA⁺CD27⁺ (central memory), CD45RA⁺CD27⁻ (effector/memory CD4⁺ and preterminally differentiated effector CD8⁺ T cells) and CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻ (terminally differentiated cytotoxic effector) [26–30].

Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles (TREC)

Thymic output was studied in six VR and eight VNR children by measuring TREC in sequential samples collected at HAART entry and during therapy (1, 3, 6, 9, 12, 18 and 24 months). TREC levels were analysed by real-time polymerase chain reaction (PCR), exactly as described previously [15,16].

Lipopolysaccharide (LPS) levels

Plasma samples were diluted fivefold with endotoxin-free water and then heated to 70°C for 10 min to inactivate plasma proteins. Plasma LPS was quantified with a commercially available assay (Limulus amoebocyte lysate QCL-1000; Cambrex, Milan, Italy) according to the manufacturer's protocol.

Statistical analysis

Differences in characteristics among infants were analysed using non-parametric tests. The Mann-Whitney test was used to compare data between groups, and the Wilcoxon non-parametric test was used to compare data within a group. TREC and CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cell count data obtained in sequential samples were analysed by linear regression analysis, and the slopes of TREC/ 1×10^5 PBMC per day and CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells/ μ l per day were calculated individually. Correlations between different parameters were analysed using the non-parametric Spearman's test. Analyses were performed with SPSS statistical software (version 12.0).

Results

Immunological and virological characteristics of HIV-1-infected children

Thirty HIV-1-infected children and 17 uninfected children were studied. All HIV-1-infected children were studied at

Table 1. Immunological and virological characteristics of the studied population of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected, highly active anti-retroviral therapy (HAART)-treated children.

Characteristics	Control group*	Total number of HIV-1-infected children before HAART	<i>P</i> ^a	Virological responder		<i>P</i> ^b	Virological non-responder		<i>P</i> ^b
				Baseline	After HAART		Baseline	After HAART	
Number of children	17	30		14	14		16	16	
Age (years)	8.7 (2.5–17)	9.3 (2–14)		9.4 (2.8–14.2)	11.8 (4.8–16)		6.4 (2–14)	8.4 (4–17)	
Lymphocyte subsets									
% CD4 ⁺	28.8 (11–49)	10 (0–34)	<0.001	13.3 (0–34)	28.8 (18–49)	<0.001	7.4 (2.5–29)	17.6 (6.5–35.7)	0.001
CD4 ⁺ /μl	750 (369–2338)	272 (5–916)	<0.001	345 (5–571)	686 (439–1851)	<0.001	210 (10–916)	433 (63–1126)	0.008
% CD8 ⁺	17.5 (9.9–29.1)	44 (6–72)	<0.001	42.6 (25–72)	32.3 (19–54)	0.003	46 (20–58)	51 (23–70)	0.387
CD8 ⁺ /μl	509 (239–1884)	739 (99–3664)	0.12	702 (225–2046)	858 (286–1570)	0.391	896 (99–3664)	1078 (284–3451)	0.332
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.9 (1–3.1)	0.4 (0.1–1.2)	<0.001	0.4 (0.1–1.2)	1 (0.4–2)	<0.001	0.3 (0.1–0.9)	0.6 (0.1–1.3)	0.004
HIV-1 RNA log ₁₀ copies/ml	–	4.5 (2.6–6.1)	–	4.3 (3.2–5.6)	1.6 (1.6–2.4)	<0.001	4.9 (2.6–6.1)	4.7 (2.9–5.6)	0.033

*Control group: age-matched HIV-1-negative children. Values were expressed as the median (ranges in parenthesis). *P*^a values between the control group and total HIV-1-infected children at baseline. *P*^b values between baseline and after HAART in virological responders and virological non-responders.

baseline and after approximately 2 years (median 23 months; range 19–30 months) of HAART. The immunological and virological characteristics at baseline and after HAART are described in Table 1. Before therapy, HIV-1-infected children had a median plasma viraemia of 4.5 log₁₀ copies/ml. Both CD4⁺ T cell percentage and count were significantly lower than those of HIV-1-uninfected controls. In contrast, the CD8⁺ T cell percentage was higher than that of uninfected children. At baseline, CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts and percentages were not significantly different in the VR and VNR groups. After 2 years of therapy, there was a significant increase in CD4⁺ T cell percentage and count in both the VR (13–29%, *P* < 0.001, and 345–686 cells/μl, *P* < 0.001, respectively) and VNR groups (7–17%, *P* = 0.001, and 210–433 cells/μl, *P* = 0.008, respectively). After 2 years of HAART, CD8⁺ T cell percentage decreased in VR children (*P* = 0.003); however, the absolute CD8⁺ T cell counts did not change significantly in either group, yet tended to increase in VNR children.

T cell subsets in uninfected and HIV-1-infected children at baseline

At baseline, compared to the control group, HIV-1-infected children had significantly lower cell counts in all CD4⁺ T cell subsets (naive 157 *versus* 415 cells/μl, *P* < 0.0001; central memory 85 *versus* 290 cells/μl, *P* < 0.0001; effector/memory 25 *versus* 77 cells/μl, *P* = 0.0002) (Fig. 1a). Conversely, HIV-1-infected children had higher cell counts in all CD8⁺ T cell

subsets (pre-effectors 131 *versus* 34 cells/μl, *P* = 0.002; cytotoxic effector 185 *versus* 37 cells/μl, *P* = 0.001; and central memory 204 *versus* 121 cells/μl, *P* = 0.038), except naive CD8⁺ T cells, which were significantly lower in HIV-1-infected than uninfected children (191 *versus* 316 cells/μl, *P* = 0.006) (Fig. 1b). Interestingly, CD4⁺CD38⁺ T cells were lower (65 *versus* 209 cells/μl, *P* < 0.0001), while CD8⁺CD38⁺ T cells were higher in infected *versus* uninfected children (116 *versus* 25 cells/μl, *P* = 0.0001) (Fig. 1b).

Changes in T cell subsets during HAART in VR and VNR children

At baseline, CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets of VR children did not differ significantly from those of the VNR group, even if pre-effector (CD45RA⁺CD27⁻), effector (CD45RA⁺CD27⁻) and CD38⁺ CD8⁺ T cell counts were more variable in VNR than VR children (Fig. 2a,b). After 2 years of HAART, CD4⁺ T cell counts increased in both groups, but in a different manner. In VR children, the peripheral CD4⁺ T cell increase was significant in naive (168–462 cells/μl, *P* = 0.001), central memory (97–213 cells/μl, *P* = 0.002) and effector/memory cell subsets (32–59 cells/μl, *P* = 0.035) and reached values similar to those observed in the uninfected children (Fig. 3a). Conversely, in VNR children, only naive CD4⁺ T cells increased significantly (113–263 cells/μl, *P* = 0.015), while values of all other CD4⁺ T cell subsets remained significantly lower than those observed in uninfected children (Fig. 3b). CD4⁺CD38⁺ T cells increased in both VR and VNR

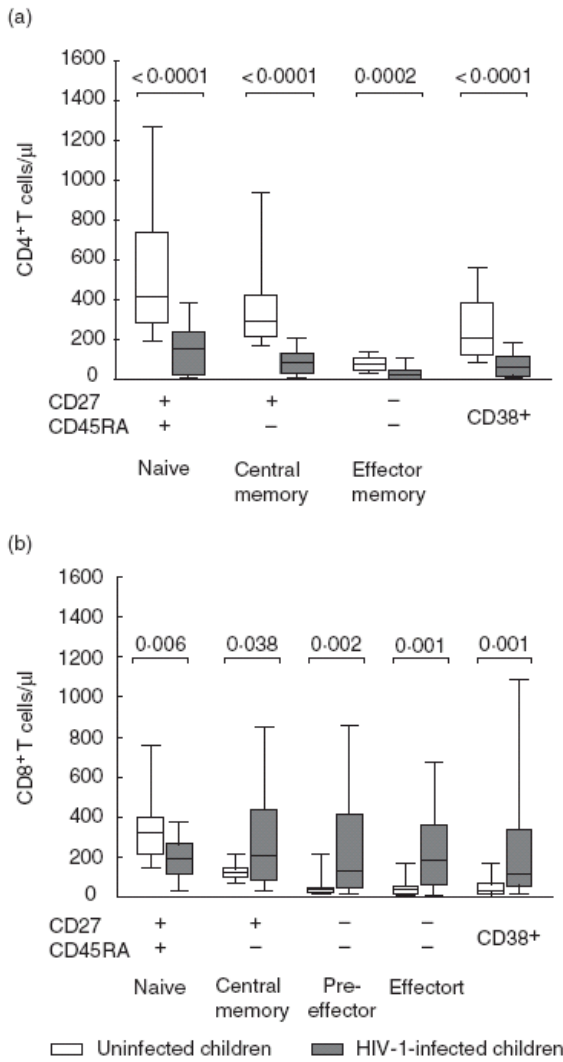


Fig. 1. The phenotypic characteristics of CD4⁺ and CD8⁺ T subsets from 17 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-uninfected children and 30 HIV-1-infected children at highly active anti-retroviral therapy initiation are illustrated. CD27, CD45RA and CD38 expression in CD3⁺CD4⁺ T cells (a) and CD3⁺CD8⁺ T cells (b) were analysed by flow cytometry. Boxes and whiskers represent the 25th–75th and 10th–90th percentiles, respectively; the median is the central line in each box. *P*-values were determined by the Mann–Whitney *U*-test.

groups (66–142 cells/μl, *P* = 0.002, and 65–124 cells/μl, *P* = 0.045, respectively; Fig. 3a,b). A positive correlation between CD4⁺CD38⁺ and CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cell counts was observed at baseline and after HAART in both VR (at baseline *r*_s = 0.84, *P* = 0.0002; and after HAART *r*_s = 0.55, *P* = 0.05) and VNR children (*r*_s = 0.91, *P* < 0.0001; and *r*_s = 0.80, *P* = 0.0002, respectively). There was also a positive correlation between the increase of naive and CD38⁺ CD4⁺ T cell counts in both VR (*r*_s = 0.51, *P* = 0.04) and VNR groups (*r*_s = 0.96, *P* < 0.0001). Although the total CD8⁺ T cell

count did not change during HAART (Table 1), a rise in naive CD8⁺ T cell subsets was observed in both VR (from 195 to 358 cells/μl, *P* = 0.006) and VNR children (from 165 to 288 cells/μl, *P* = 0.004). No significant changes were observed in the other CD8⁺ T cell subsets (central memory, pre-effector and cytotoxic effector cells) in either group, although the absolute cell numbers tended to increase in VNR children. CD8⁺CD38⁺ T cells decreased significantly

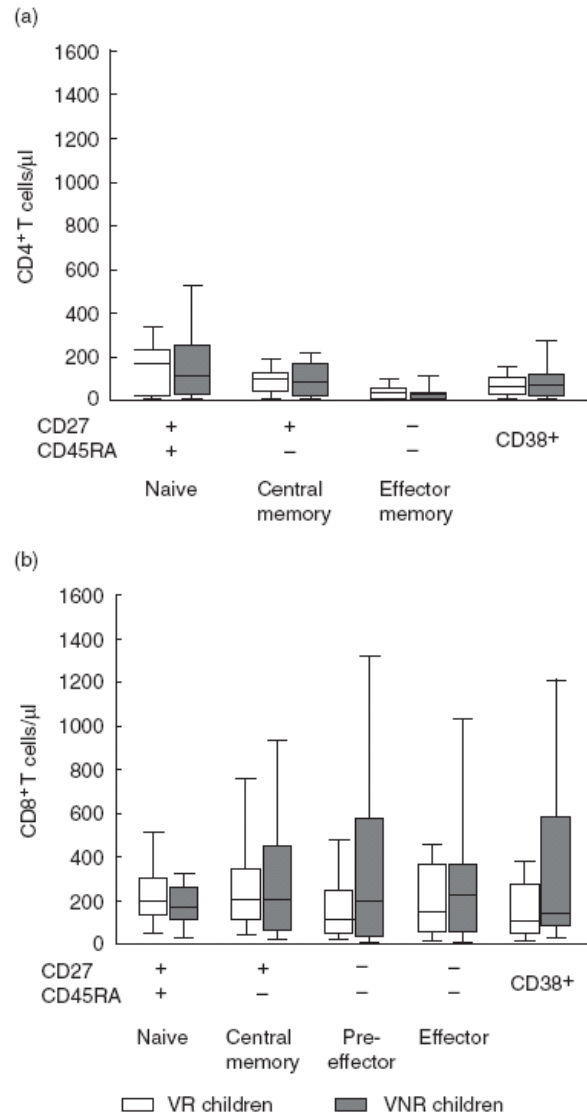


Fig. 2. T cell subsets are illustrated in virological responder (VR) and virological non-responder (VNR) children at highly active anti-retroviral therapy initiation. CD27, CD45RA and CD38 expression in CD3⁺CD4⁺ T cells (a) and CD3⁺CD8⁺ T cells (b) were analysed in 14 VR and 16 VNR children by flow cytometry. Boxes and whiskers represent the 25th–75th and 10th–90th percentiles, respectively; the median is the central line in each box. *P*-values were determined by the Mann–Whitney *U*-test.

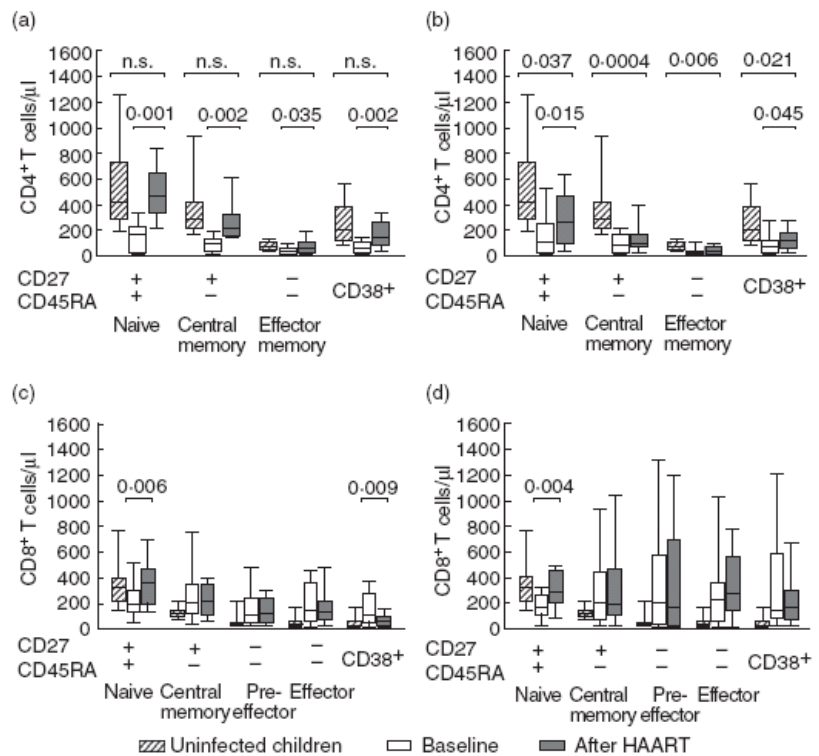


Fig. 3. T cell repopulation in virological responder (VR) and virological non-responder (VNR) children is illustrated. CD27, CD45RA and CD38 expression in CD3⁺CD4⁺ T cells (a and b) and CD3⁺CD8⁺ T cells (c and d) were analysed in 14 VR children (a and c) and in 16 VNR children (b and d) at baseline and after 2 years of highly active anti-retroviral therapy. Data were compared with those obtained from 17 uninfected children. Boxes and whiskers represent the 25th–75th and 10th–90th percentiles, respectively; the median is the central line in each box. *P*-values were determined by the Wilcoxon test.

only in VR children (107–60 cells/µl, *P* = 0.003), while these remained high in VNR children (Fig. 3c,d).

Relationship between TREC and naive CD4⁺ T cells in VR and VNR children

TREC levels were quantified in six VR and eight VNR children for whom sequential samples during therapy were available. At baseline, TREC levels in PBMC and CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cell counts in the VR children did not differ significantly from those in the VNR group (Fig. 4a,b). After 2 years of HAART, TREC levels increased significantly in both VR (1503–5018, *P* = 0.04) and VNR children (595–2117, *P* = 0.03, Fig. 4a). In this subset of children the increase in CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells occurred in both groups (Fig. 4b), and reflected the increase observed in the entire VR and VNR study groups (Fig. 3a,b). A positive correlation between TREC levels and CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells was observed in both groups at baseline (VR, *r*_s = 0.94, *P* = 0.005; VNR, *r*_s = 0.83, *P* = 0.01) and after HAART (VR, *r*_s = 0.88, *P* = 0.0019; VNR, *r*_s = 0.81, *P* = 0.015). Although the slope of the increase in TREC did not differ significantly in VR and VNR children, the slope of the increase in CD4⁺ naive T cells was lower in VNR than VR children (Fig. 4c,d). Moreover, the slopes of the TREC were correlated positively with the slopes of the CD4⁺ naive T cells in VR (*r*_s = 0.90, *P* = 0.037), but not in VNR children (*r*_s = 0.48, *P* = 0.33).

LPS levels in HIV-1-infected children

Plasma LPS levels were quantified in uninfected and HIV-1-infected children at baseline, before initiation of HAART. The patients showed significantly higher values than the control group (*P* = 0.0001; Fig. 5a); however, baseline LPS levels were not considerably different in the VR and VNR groups. After 2 years of HAART (Fig. 5b), LPS levels were unchanged in VR children but were increased still further in VNR children (56–67 pg/ml, *P* = 0.035).

Discussion

HAART has dramatically modified the course of HIV-1 infection, resulting in a drastic decrease of viral load to undetectable levels and a significant increase in the peripheral CD4⁺ T cell repopulation. In HAART-treated children, immune repopulation may occur despite persistent viraemia [15,16,19–22]. To add to the scarce information available on immune reconstitution in HIV-1-infected children, we investigated peripheral immune repopulation in children with and without a virological response to therapy.

Our study demonstrated that immune reconstitution was quite different in VR and VNR children with regard to both CD4⁺ and CD8⁺ T cell compartments. Moreover, immune activation decreased in VR children, yet persisted and even increased in VNR children.

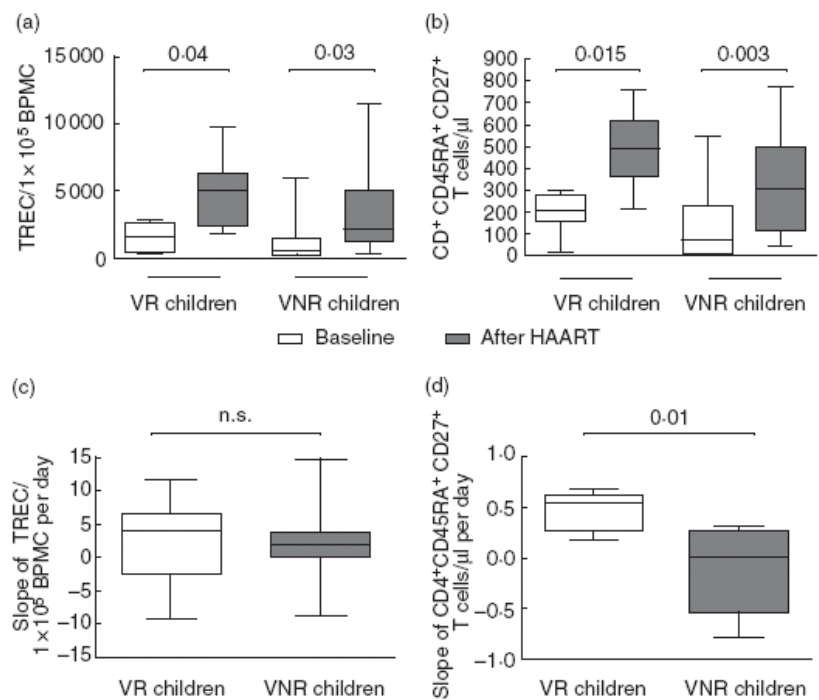


Fig. 4. The dynamics of thymic output and CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells in six virological responder (VR) and eight virological non-responder (VNR) children is illustrated. T cell receptor rearrangement excision circles (TREC) (a) and CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cell levels (b) were analysed at baseline and after 2 years of highly active anti-retroviral therapy. Slopes of TREC (c) and CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells (d) in VR and VNR children. Boxes and whiskers represent the 25th–75th and 10th–90th percentiles, respectively; the central line in each box indicates the median. *P*-values were determined by the Wilcoxon (a and b) and the Mann–Whitney *U*-tests (c and d).

Prior to HAART initiation, VR and VNR patients had similar levels of plasma viraemia and did not show significant differences in any T cell subsets and TREC level. When compared to age-matched HIV-1-uninfected children, both VR and VNR children showed cell depletion in all CD4⁺ T cell subsets, but a higher cell count in all CD8⁺ T cell subsets except naive cells. This finding, together with the high level of activated CD8⁺CD38⁺ cells, is in agreement with the concept that HIV-1 infection drives a broad activation and differentiation of CD8⁺ T cells, pushing them from naive to late-stage differentiation [31].

After 2 years of HAART, immune reconstitution in VR children occurred in all cell subsets, while in the VNR children only naive CD4⁺ T cells increased. Of interest, both VR and VNR children showed an increase in TREC levels. This result is in agreement with previous findings [15,16,19,21] and indicates that the persistence of viraemia during HAART does not impair the increase in thymic function and the subsequent output of naive cells. The finding that naive CD8⁺ T cells increased in both VR and VNR groups confirms that thymic function was recovered. However, the increase in TREC correlated with the increase in naive CD4⁺ T cells in VR, but not in VNR children, in agreement with a previous study [15]. In addition, for a similar TREC increase, the naive CD4⁺ T cell increase was lower in VNR than VR children. It is possible that thymic emigrants in the context of ongoing viraemia are activated from circulating viral antigen, proliferate and differentiate into memory cell subsets [32], which are more susceptible to HIV-1 infection than naive cells. Although the mechanisms underlying partial recovery of immune function despite virological failure remain to be

elucidated, it is likely that HAART prevents HIV-1 replication in T cell progenitors [33–35]. In addition, the impaired replicative capacity of drug-resistant viruses and the shift of viral co-receptor usage from CXCR4 expressed on naive cells to CCR5 expressed on memory CD4⁺ T cells [20,33,36] probably both contribute to peripheral immune repopulation by naive CD4⁺ T cells.

Along with the rise in CD4⁺, CD4⁺CD38⁺ cells increased in both VR and VNR groups and these were correlated positively with increases in naive cells. As opposed to what occurs in adults, these results suggest that CD38 is a marker of cell immaturity rather than cell activation in CD4⁺ T cells in children [37,38]. Finding that its expression is high in naive CD4⁺ T cells [39], that it decreases over time [40] and that it increases in CD4⁺ T cells during immune reconstitution [37,38] all support this concept. Besides representing a marker of cell immaturity, CD38 in CD4⁺ T cells is likely to have multiple functional activities [37]. Further studies are required to clarify in depth the role of CD38 in CD4⁺ T cells in children.

None the less, our study demonstrates that persistence of viraemia greatly impairs the expansion of memory and effector CD4⁺ T cell subsets. In VR children, these cell subsets increased and reached levels similar to those observed in uninfected controls. The peripheral CD4⁺ T cell subset repopulation may be due to an expansion of memory and effector CD4⁺ T cells, cellular redistribution from tissue/lymph nodes to the periphery and reduced apoptosis [41]. In VNR children, these cell subsets remained significantly lower. This may be due to the persistence of circulating virions in VNR children and also to the greater susceptibility

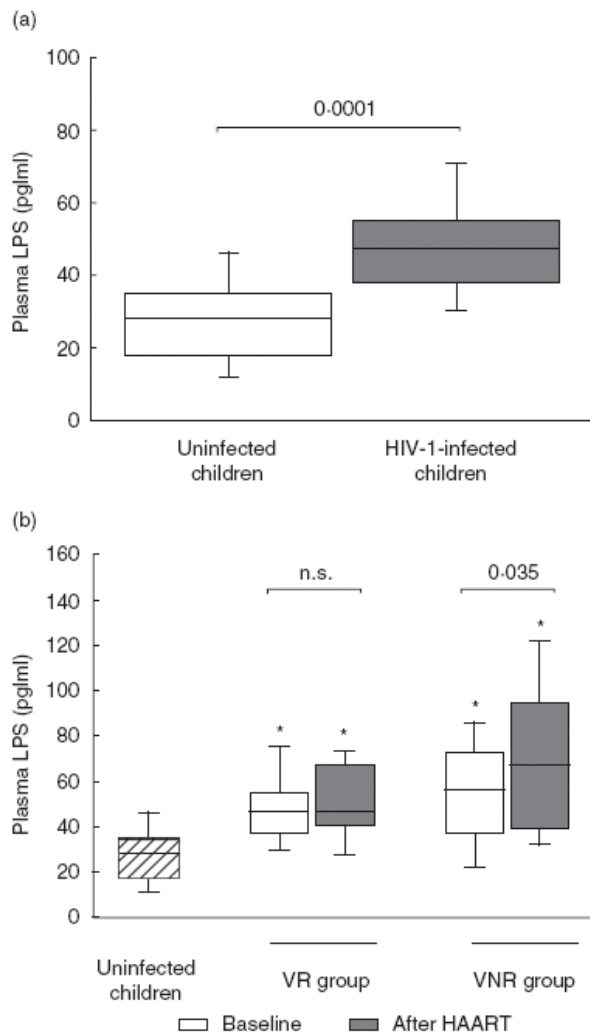


Fig. 5. Microbial translocation in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected children is illustrated. Plasma lipopolysaccharide levels were determined in HIV-1-uninfected and HIV-1-infected children before highly active anti-retroviral therapy (HAART) initiation (a) and in virological responder (VR) and virological non-responder (VNR) children at baseline and after HAART (b). Boxes and whiskers represent the 25th–75th and 10th–90th percentiles, respectively; the central line in each box indicates the median. * $P < 0.001$ in comparison of the control group versus HIV-1-infected children.

of these cells to HIV-1 infection compared to naive cells [33,42]. The peripheral depletion may also be induced by a decrease in cell proliferation and an increase in cell death [41]. Further studies with markers of cell apoptosis and survival, not feasible in the present analysis due to the small numbers of cells available, will be very useful to clarify this aspect.

With regard to the CD8⁺ T cell compartment, the percentage of CD8⁺ T cells decreased in VR children; this percentage decrease was significant not only because of the CD8⁺ low-

ering effect, but also because CD4⁺ increased notably. No significant changes occurred in memory and effector cell subsets, yet absolute cell counts tended to further increase in VNR children. This finding suggests that HIV-1-driven chronic stimulation and activation continued to persist in VNR children. This was also supported by the finding that activated CD8⁺CD38⁺ T cells decreased significantly in VR children, yet remained persistently high in VNR children. Reduction of CD38 expression in the VR group may reflect a reduction of antigenic stimulation due to the undetectable plasma viraemia [37,43]. Immune activation is driven not only by HIV-1, but also by other pathogens. HIV-1 infection occurs in the gastrointestinal tract, damaging the immune component of the gastrointestinal mucosa, with subsequent translocation of microbial products such as LPS, a potent immunostimulatory molecule that affects systemic immune activation. At baseline, circulating levels of LPS were higher in HIV-1-infected children than in controls. While a reduction in LPS levels has been reported in HIV-1-infected adults during therapy [7], LPS levels remained roughly stable in VR children, but tended to increase even further in VNR children during HAART. This finding strongly supports the concept that persistence of immune activation in children might be caused not only by persistence of HIV-1 antigens but also by other pathogens and microbial products.

In summary, this study has demonstrated that HAART induces immune repopulation of different CD4⁺ T cell subpopulations only in children with a virological response to therapy. Moreover, persistence of viraemia did not affect thymic output and the increase in naive cells, but greatly impaired CD4⁺ T cell differentiation. The persistence of HIV-1 virions/antigens, together with circulating microbial products, sustained high levels of activated CD8⁺CD38⁺ T cells. The persistence of systemic immune activation might ultimately determine the progression to AIDS.

Acknowledgements

We thank Pierantonio Gallo for artwork and Lisa Smith for editorial assistance. This work was supported by ISS grant no. 45G.12, grant no. 40 G21 and by the PENTA Foundation.

References

- De Rossi A, Masiero S, Giaquinto C *et al.* Dynamics of viral replication in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Invest* 1996; **97**:323–30.
- Luzuriaga K, Wu H, McManus M *et al.* Dynamics of human immunodeficiency virus type 1 replication in vertically infected infants. *J Virol* 1999; **73**:362–7.
- Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA *et al.* Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999; **179**:859–70.

- 4 Sankaran S, Guadalupe M, Reay E *et al*. Gut mucosal T cell responses and gene expression correlate with protection against disease in long-term HIV-1-infected nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:9860–5.
- 5 Valdez H, Lederman MM. Cytokines and cytokine therapies in HIV infection. *AIDS Clin Rev* 1997–1998; **187**–228.
- 6 Behbahani H, Walther-Jallow L, Klareskog E *et al*. Proinflammatory and type 1 cytokine expression in cervical mucosa during HIV-1 and human papillomavirus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; **45**:9–19.
- 7 Brechley JM, Price DA, Schacker TW *et al*. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006; **12**:1365–71.
- 8 Mehndru S, Poles MA, Tenner-Racz K *et al*. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4⁺ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004; **200**:761–70.
- 9 Purswani M, Johann-Liang R, Cervia J, Noel GJ. Effect of changing antiretroviral therapy on human immunodeficiency virus viral load: experience with fifty-four perinatally infected children. *Pediatr Infect Dis J* 1999; **18**:512–6.
- 10 Gibb DM, Newberry A, Klein N, De Rossi A, Grosch-Woerner I, Babiker A. Immune repopulation after HAART in previously untreated HIV-1-infected children. Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) Steering Committee. *Lancet* 2000; **355**:1331–2.
- 11 Picker LJ, Maino VC. The CD4⁺ T cell response to HIV-1. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**:381–6.
- 12 Lederman MM, Valdez H. Immune restoration with antiretroviral therapies. *JAMA* 2000; **284**:223–8.
- 13 Pakker NG, Notermans DW, De Boer RJ *et al*. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 1998; **4**:208–14.
- 14 Kaufmann GR, Zaunders J, Murray J *et al*. Relative significance of different pathways of immune reconstitution in HIV type 1 infection as estimated by mathematical modeling. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; **17**:147–59.
- 15 Ometto L, De Forni D, Patiri F *et al*. Immune reconstitution in HIV-1-infected children on antiretroviral therapy: role of thymic output and viral fitness. *AIDS* 2002; **16**:839–49.
- 16 De Rossi A, Walker AS, Klein N, De Forni D, King D, Gibb DM. Increased thymic output after initiation of antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected children in the Paediatric European Network for treatment of AIDS (PENTA) 5 trial. *J Infect Dis* 2002; **186**:312–20.
- 17 Resino S, Galan I, Bellon JM, Navarro ML, Leon JA, Munoz-Fernandez MA. Characterizing the immune system after long-term undetectable viral load in HIV-1-infected children. *J Clin Immunol* 2003; **23**:279–89.
- 18 Fraaij PL, Verweel G, Van Rossum AM *et al*. Sustained viral suppression and immune recovery in HIV type 1-infected children after 4 years of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2005; **40**:604–8.
- 19 Chavan S, Bennuri B, Kharbanda M, Chandrasekaran A, Bakshi S, Pahwa S. Evaluation of T cell receptor gene rearrangement excision circles after antiretroviral therapy in children infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2001; **183**:1445–54.
- 20 Bagnarelli P, Vecchi M, Burighel N *et al*. Genotypic and phenotypic correlates of the HIV type 1 env gene evolution in infected children with discordant response to antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; **20**:1306–13.
- 21 Resino S, Galan I, Perez A *et al*. HIV-infected children with moderate/severe immune-suppression: changes in the immune system after highly active antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 2004; **137**:570–7.
- 22 Ghaffari G, Passalacqua DJ, Caicedo JL, Goodenow MM, Slesman JW. Two-year clinical and immune outcomes in human immunodeficiency virus-infected children who reconstitute CD4 T cells without control of viral replication after combination antiretroviral therapy. *Pediatrics* 2004; **114**:604–11.
- 23 Lecossier D, Bouchennet P, Schneider P, Clavel F, Hance AJ. Discordant increases in CD4⁺ T cells in human immunodeficiency virus-infected patients experiencing virologic treatment failure. Role of changes in thymic output and T cell death. *J Infect Dis* 2001; **183**:1009–16.
- 24 Stoddart CA, Liegler TJ, Mammano F *et al*. Impaired replication of protease inhibitor-resistant HIV-1 in human thymus. *Nat Med* 2001; **7**:712–8.
- 25 Hunt P, Deeks S, Bangsberg D *et al*. The independent effect of drug resistance on T cell activation in HIV infection. *AIDS* 2006; **20**:691–9.
- 26 Van Baarle D, Kostense S, Van Oers MH, Hamann D, Miedema F. Failing immune control as a result of impaired CD8⁺ T-cell maturation: CD27 might provide a clue. *Trends Immunol* 2002; **23**:586–91.
- 27 Schiott A, Lindstedt M, Johansson-Lindbom B *et al*. CD27⁺ CD4⁺ memory T cells define a differentiated memory population at both the functional and transcriptional levels. *Immunology* 2004; **113**:363–70.
- 28 Bekker V, Bronke C, Scherpbier HJ *et al*. Cytomegalovirus rather than HIV triggers the outgrowth of effector CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells in HIV-1-infected children. *AIDS* 2005; **19**:1025–34.
- 29 Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**:745–63.
- 30 Emu B, Sinclair E, Favre D *et al*. Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *J Virol* 2005; **79**:14169–78.
- 31 Jordan KA, Furlan SN, Gonzalez VD *et al*. CD8 T cell effector maturation in HIV-1-infected children. *Virology* 2006; **347**:117–26.
- 32 Brechley JM, Douek DC, Ambrozak DR *et al*. Expansion of activated human naive T-cells precedes effector function. *Clin Exp Immunol* 2002; **130**:432–40.
- 33 Wang YM, Wang B, Dyer WB, Lachireddy K, Peng NK, Saksena NK. Evidence for predominance of CCR5-using HIV-1 strains during highly active antiretroviral therapy. *Curr HIV Res* 2007; **5**:221–34.
- 34 Brechley JM, Hill BJ, Ambrozak DR *et al*. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) *in vivo*: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* 2004; **78**:1160–8.
- 35 Ye P, Kirschner DE, Kourtis AP. The thymus during HIV disease: role in pathogenesis and in immune recovery. *Curr HIV Res* 2004; **2**:177–83.
- 36 Mammano F, Trouplin V, Zennou V, Clavel F. Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. *J Virol* 2000; **74**:8524–31.
- 37 Savarino A, Bottarel F, Malavasi F, Dianzani U. Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or

- an active player in virus/host interactions? *AIDS* 2000; **14**:1079–89.
- 38 Resino S, Seoane E, Gutierrez MD, León JA, Muñoz-Fernández MA. CD4+ T-cell immunodeficiency is more dependent on immune activation than viral load in HIV-infected children on highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **42**:269–76.
- 39 De Martino M, Rossi ME, Azzari C, Gelli MG, Galli L, Vierucci A. Different meaning of CD38 molecule expression on CD4+ and CD8+ cells of children perinatally infected with human immunodeficiency virus type 1 infection surviving longer than five years. *Pediatr Res* 1998; **43**:752–8.
- 40 De Vries E, De Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM *et al.* Longitudinal survey of lymphocyte subpopulations in the first year of life. *Pediatr Res* 2000; **47**:528–37.
- 41 McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 2001; **410**:974–9.
- 42 Douek DC, Brenchley JM, Betts MR *et al.* HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 2002; **417**:95–8.
- 43 Rosenblatt H, Stanley K, Song L *et al.* Immunological response to highly active antiretroviral therapy in children with clinically stable HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005; **192**:445–55.

Original article

Early therapy in HIV-1-infected children: effect on HIV-1 dynamics and HIV-1-specific immune response

Marisa Zanchetta¹, Alessia Anselmi¹, Daniela Vendrame¹, Osvalda Rampon², Carlo Giaquinto², Antonio Mazza³, Daniele Accapezzato⁴, Vincenzo Barnaba⁴ and Anita De Rossi^{1*}

¹AIDS Reference Center, Unit of Viral Oncology, Department of Oncology and Surgical Sciences, University of Padova, IOV-IRCCS, Italy

²Department of Pediatrics, University of Padova, Italy

³Pediatrics Unit, Ospedale S. Chiara, Trento, Italy

⁴Department of Internal Medicine, University 'La Sapienza' Rome, Italy

*Corresponding author: E-mail: anita.derossi@unipd.it

Background: Perinatal HIV-1 infection is acquired in the milieu of a developing immune system, leading to high levels of uncontrolled viral replication. Few data have been reported that address the viral dynamics and immunological response in infants who initiated aggressive antiretroviral therapy (ART) shortly after birth.

Methods: Six HIV-1-infected infants who started ART within 3 months of age were studied. The median follow-up was 61 months. Plasma HIV-1 RNA, cell-associated HIV-1 DNA, unspliced and multiply spliced HIV-1 mRNAs, HIV-1 antibodies, and CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets were assessed in sequential peripheral blood samples. HIV-1 cellular immune response was measured by EliSpot assay. **Results:** All children showed a decline in plasma viraemia to undetectable levels. HIV-1 DNA persisted in four children, but only two of these had detectable HIV-1 mRNA. All viral

parameters remained persistently negative in two children. Only two children produced HIV-1 antibodies, while the others, after having lost maternal antibodies, remained seronegative. No HIV-1 cellular immune response was observed in any child. Therapy interruption was performed in two children: one HIV-1-seropositive and one HIV-1-seronegative with persistently undetectable levels of all viral parameters. Rebound of HIV-1 plasma viraemia in the seronegative child was more rapid and higher than that observed in the seropositive child.

Conclusions: Early ART treatment in infants modifies the natural course of infection by controlling HIV-1 replication and reducing viral load to below the threshold levels required for onset of HIV-1 immune response, but does not prevent the establishment of a reservoir of latently infected cells that precludes virus eradication.

Introduction

The introduction of antiretroviral therapy (ART) has heralded important changes in the natural course of HIV-1 infection both in adults and children, yet ART is unable to fully suppress HIV-1 replication in chronically infected subjects. Intracellular HIV-1 mRNA and replication-competent virus can be recovered from cells, even in patients with a long period of undetectable HIV-1 RNA in plasma [1–3]. This persistence of latently infected cells prohibits eradication of the infection [4,5].

A body of evidence has demonstrated that HIV-1 replication plays a central role in the pathogenesis of HIV-1 disease [6], and several studies have suggested that the dynamics of HIV-1 during primary infection is predictive of the subsequent disease outcome both in adults and children [7,8]. Studies in adults have shown

that treatment of primary infection with ART resulted in a greater and more rapid reduction in HIV-1 plasma viraemia compared with untreated patients [9], as well as decreasing the cell-associated HIV-1 DNA load more efficiently than when ART was initiated during the chronic phase of infection [10]. Although unable to eradicate infection, ART administration during primary infection – by restricting viral replication and preserving immune function – limits the rate of disease progression. Furthermore, early ART initiation can enhance viral control after ART discontinuation.

Although depletion of CD4⁺ T-cells and disease progression occur more rapidly in children than in adults, few studies have been performed to evaluate the effect of early ART in infants. In one study early ART treatment was associated with good clinical and

immunological outcomes after 72 weeks of follow up, but a high rate of virological failure (that is, plasma HIV-1 RNA never <400 copies/ml or rebounded to >400 copies/ml at 72 weeks) was reported [11]. In another study, ART initiation prior to 3 months of age was associated with a longer period of viral suppression in plasma compared with that observed in infants who had received ART after 3 months of age [12]. Data concerning intracellular HIV-1 dynamics and HIV-1-specific immune responses in early ART-treated infants are very scarce. In the few infants studied, suppression of HIV-1 RNA plasma viraemia for 1–2 years was associated with a lack of virus isolation from the peripheral blood compartment [13] and a lack of HIV-1-specific immune responses [13,14].

In this study, we investigated the intra- and extracellular HIV-1 infection profile and the HIV-1-specific immune responses in long-term treated children who had received ART from the first few months of life.

Methods

Patients

This study included six HIV-1-infected children, born to HIV-1-seropositive mothers who had not received antiretroviral prophylaxis, and followed at the Paediatric Department of Padova University, Italy. The infectious status of the infants was defined by virus isolation and the polymerase chain reaction (PCR) assay performed as previously reported [15]. The inclusion criterion was the initiation of highly active ART within 3 months of age. CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts, anti-HIV-1 antibodies and plasma HIV-1 RNA levels were followed over time. Levels of proviral HIV-1 DNA and cell-associated HIV-1 mRNAs were evaluated in cryo-preserved samples.

Quantification of HIV-1 RNA in plasma

Plasma HIV-1 RNA levels were determined by reverse transcriptase-PCR (Roche Amplicor Monitor System, New Jersey, USA) according to the manufacturer's instructions, with a lower limit of detection of 400 HIV-1 RNA copies/ml when using the standard protocol and a detection limit of 50 HIV-1 RNA copies/ml when using the ultrasensitive protocol.

Quantification of HIV-1 mRNAs in cells

Levels of cell-associated HIV-1 RNAs were quantified by real-time PCR, as previously described [3]. Briefly, 1 µg RNA extracted from cells ($1-5 \times 10^6$) was retrotranscribed using the TaqMan Reverse Transcription reagents assay (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Unspliced HIV-1 mRNAs (HIV-1 RNAs) and multiply spliced HIV-1 mRNAs (HIV-1 RNAs), were

quantified by real-time PCR using the primers US1 forward (5'-TTAAGTGTTTCAATTGTGGCAAAGA-3'; nt 1956–1981) and US2 reverse (5'-AAAAATTAGCCTGTCTCTCAGTACAATCT-3'; nt 2059–2122) and MS1 forward (5'-AAAGGGAAACCAGAGGAGCTCT-3'; nt 672–693) and MS2 reverse (5' GCCTGTCGGTCCCCTC-3'; nt 8438–8454), and the probes USP (FAM-5'-CCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATG-3'-TAMRA; nt 2007–2035) and MSP (FAM-5'-TCGACGCAGGACTCGGCTTGC-3'-TAMRA; nt 695–715) (HIVPV22 genome, GenBank accession code K02083). The HIV-1 mRNA copies were expressed relative to 10^6 copies glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [3].

HIV-1 DNA quantification

Proviral HIV-1 DNA copies per 10^7 peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were quantified by real-time PCR, as previously described [16].

Viral phenotype analyses

Primary isolates were obtained by co-culture of PBMCs from each child with phytohaemoagglutinin (PHA)-stimulated PBMC from healthy donors, as previously described [17]. Viral phenotype analysis was performed in U87MG-CCR5 and U87MG-CXCR4 cell lines that stably expressed CD4 and CCR5 or CXCR4 coreceptor [18]. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 50 µg/ml gentamicin, 2% glutamine and 10% fetal calf serum (FCS). For infection assays, cells were seeded in 48-well plates (Falcon, Grenoble, France) at a concentration of 5×10^5 cells/well for 24 h before infection. The cells were washed twice with fresh medium and then exposed to viral isolate (10,000 pg of p24 protein equivalent/well) in a final volume of 0.5 ml. The supernatants were harvested 8 days after infection, and the amount of HIV-1 p24 antigen was quantified using a commercial assay (Vironostika HIV-1 Antigen, Biomérieux, Rome, Italy). In agreement with the proposed classification [19], the viruses were typed as R5, X4, or R5X4 according to their coreceptor usage.

HIV-1 genotyping analyses

Analyses of protease (PR) and reverse transcriptase (RT) sequences of the HIV-1 *pol* gene were performed. HIV-1 DNA was obtained by lysis of 1×10^6 PBMCs, as previously described [8], while HIV-1 RNA was extracted from plasma and PBMC samples using a commercial kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Extracted RNA was retrotranscribed using Superscript™ III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. A nested-PCR amplification was performed using the followed primer pairs: outer PR primers

PR1-forward (5'-GATAGACAAGGAACTGTATC-CTTTA-3'; nt 2268–2292) and PR2-reverse (5'-ATCCATTCTGGCTTTAATTTTACT-3'; nt 2645–2621), inner PR primers PR3-forward (5'-CTTCCCTCAGATCACTCTTT-3'; nt 2294–2313) and PR4-reverse (5'-TGGCTTTAATTTTACTGGTA-3'; nt 2636–2617), outer RT primers RT1-forward (5'-GGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAA-GAAA-3'; nt 2529–2560) and RT2-reverse (5'-TTGACAGTCCAGCTGTCTTTTTCTGGCAG-3'; nt 3358–3330), inner RT primers RT6 FW forward (5'-GACAGAAGAAAAATAAAAGCATT-3'; nt 2672–2695), RT6-RV reverse (5'-TGGAAAGCA-CATTGTAATGATATCT-3'; nt 3044–3021), RT4-FW forward (5'-TTCAGGAAGTATACTGCATTTACC-3'; nt 2964–2987) and RT4-RV reverse (5'-TCTTTTTCTGGCAGCACTATAGGC-3'; nt 3343–3320) (HIVPV22 genome, GenBank accession code K02083) [20]. Amplification was carried out in a thermal cycler (9600, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) for 45 cycles, each of 30 s at 94°C, 30 s at 60°C and 1 min at 72°C for PR1–PR2 and RT1–RT2 primers; 30 s at 94°C, 30 s at 54°C and 1 min at 72°C for PR3–PR4 primers; and 30 s at 94°C, 30 s at 58°C and 1 min at 72°C for RT6-FW–RT6-RV and RT4-FW–RT4-RV primers.

PCR products were purified using a commercial assay (ExoSAP-IT, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) and directly sequenced using the automatic sequencer ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) and the Big Dye Terminator v1.1 cycle sequencing ready reaction kit (PE Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Sequences were analysed with Sequencing Analysis Software v.5.2 (PE Applied Biosystems) and aligned to HIVPV22 using SeqScape Software v.2.5 (PE Applied Biosystems). The HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu>) [21] was utilized to discriminate reverse transcriptase and protease mutations with a major role in conferring high or moderate level of resistance to antiretroviral drugs.

HIV-1 serology

Plasma HIV-1 antibodies were detected using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Enzygnost, Bering, Marburg, Germany) and by western blotting (HIV blot 2.2, Alfa Wasserman, Bologna, Italy).

In vitro antibody production

Spontaneous *in vitro* antibody production (IVAP) was tested using the standardized protocol [22]. Briefly, PBMC at a concentration of 2×10^6 cells/ml were cultured in RPMI medium supplemented with 10%

FCS, 1% L-glutamine, 1% non-essential amino acids, and 2×10^{-5} M 2-mercaptoethanol in the presence or absence of pokeweed mitogen (PWM; 1/100 final dilution). Cell-free supernatants were then recovered by low-speed centrifugation, and total immunoglobulin (Ig) and HIV-1-specific antibody in culture supernatants were measured by solid-phase radioimmunoassay as previously reported [23].

EliSpot assay

HIV 1 specific responses of CD8⁺ T cells were detected by EliSpot assay, performed as previously described [24]. Briefly, purified CD8⁺ T-cells were plated in duplicate at 5×10^4 cells/well in 96-well nitrocellulose-baked plates (MAHA S4510; Millipore, Bedford, MA, USA) precoated with 5 µg/ml of mouse anti-human interferon-γ monoclonal antibody (Pharmigen, San Diego, CA USA), and incubated with irradiated (5,000 rads) autologous CD8⁺-depleted PBMC (2×10^5 cells/well), used as antigen-presenting cells, and pulsed or not with the HIV-1 HLA-A2-binding peptides [24] were employed at a final concentration of 10 µg/ml. After 6 h incubation at 37°C, plates were washed and 100 µl of 2 µg/ml biotinylated mouse anti-human interferon-γ (Pharmigen) were added to each well. After 2 h incubation at room temperature and washing, 50 µl of streptavidin horseradish peroxidase (1:500 dilution) were added to each well and plates were incubated for a further 90 min at room temperature. The spots were quantified using the AID EliSpot Reader (AID GmbH, Strassberg, Germany). Results are reported as spot-forming cells (SFC) per 10^6 cells after subtraction of the background response. All peptides employed in this study have been previously described in detail [24].

Results

Characteristics of the study population

This study focused on six HIV-1 infected infants who started ART prior to 3 months of age. The immunological and virological characteristics at baseline are shown in Table 1. Median age at start of ART was 2.75 months (range 2–3 months). At ART entry, the median CD4⁺ T-cell count was 1,827 cells/µl (range 969–2,880); only one child had a CD4⁺ T-cell percentage <25%. Median HIV-1 RNA level in plasma was 6.0 (range 4.8–6.0) log₁₀ copies/ml. Virus isolation was performed in three cases and all three primary isolates were found to employ the CCR5 coreceptor. All infants were asymptomatic and initiated triple therapy, including two non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in combination with one protease inhibitor or one nucleoside reverse transcriptase inhibitor (Table 1). The median follow-up period was 61 months (range 40–87 months). Four children

remained on the initial triple drug therapy for the entire follow-up period, while two (EA05 and EA06) had therapy interruption (Table 2).

Virological and immunological changes during ART

Following the initiation of ART, HIV-1 RNA levels in plasma fell below 400 copies/ml after a median time of 17.5 weeks (range 7–30 weeks) and below 50 copies/ml after a median time of 31 weeks (range 20–40 weeks). Thereafter, and before therapy interruption, intensive follow up of these children indicated that plasma HIV-1 RNA remained mainly below detectable levels in all children. A few blips of HIV-1 RNA were observed in four infants, but all were <2,000 copies/ml of plasma (Table 2). To better investigate the extent to which viral replication was controlled, the levels of HIV-1 DNA and HIV-1 intracellular mRNAs were evaluated. The cellular HIV-1 DNA levels remained detectable for the entire follow-up period in 4/6 children (Figure 1A). In three children, HIV-1 DNA levels were measured at the initiation of ART and, after the first month, HIV-1 DNA decayed by 0.70 log₁₀ copies/1×10⁵ in subject EA04, by 0.14 log₁₀ copies/1×10⁵ in subject EA01 and by 0.06 log₁₀ copies/1×10⁵ in subject EA06. The persistence of proviral DNA and the blips of plasma

viraemia suggested a persistence of residual viral replication. To explore this possibility, intracellular levels of HIV-1 mRNAs were investigated. HIV-1 RNA_{in} and HIV-1 RNA_{out} decayed rapidly after ART initiation; thereafter, they were repeatedly detected in two children (EA01 and EA06), while only one blip of HIV-1 RNA_{in} was detected in child EA02. Notably, two children (EA04 and EA05) remained persistently negative for all HIV-1 parameters.

The percentage of CD4⁺ T-cells in peripheral blood at baseline was normal for age and <25% in only one child (EA03). After ART initiation, the percentage of CD4⁺ T-cells and total CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts remained within the normal range for age [25] in all infants (Figure 1B).

HIV-1 immune response

Only two children (EA01 and EA06) remained seropositive, whereas the others lost HIV-1-specific maternal antibodies in a median time of 13 months (range 12–14 months; Table 2) and thereafter remained persistently seronegative (Figure 1B). The clearance of HIV-1-specific antibodies was similar to that observed in uninfected children born to HIV-1-seropositive mothers [26,27], indicating the lack of autochthonous HIV-1-specific antibody production;

Table 1. Characteristics of the study population at baseline

Patient	CD4 ⁺ T-cell count, cells/μl (%)	Plasma HIV-1 RNA, log ₁₀ copies/ml	HIV-1 primary isolate phenotype	Age at ART entry, months	Antiretroviral therapy
EA01	2,880 (32)	6.0	R5	3	AZI, 3TC, NVP
EA02	1,361 (27)	5.3	ND	2	d4T, 3TC, NVP
EA03	969 (16)	4.8	ND	2	AZI, 3TC, NVP
EA04	1,950 (32)	6.0	R5	2.5	d4T, ddI, NFV
EA05	1,872 (36)	6.0	ND	3	AZI, 3TC, NFV
EA06	1,783 (33)	6.0	R5	3	d4T, ddI, NFV

AZI, zidovudine; ddI, didanosine; d4T, stavudine; ND, not determined; NFV, nelfinavir; NVP, nevirapine; 3TC, lamivudine.

Table 2. Follow up of ART-treated children

Patient	HIV-1 RNA <400 copies/ml, weeks	RNA <50 copies/ml, weeks	Time to seroreversion, months	Blips of HIV-1 RNA, copies/ml	Length of follow up, months	Length of follow-up before TI, months
EA01	10	20	–	95/261/1,580	49	–
EA02	7	30	13	94/86	56	–
EA03	30	40	14	130/119	40	–
EA04	28	32	12	–	66	–
EA05	8	22	13	–	87	49
EA06	25	33	–	159/135/557/932	70	56

TI, therapy interruption.

this was confirmed in one child by the IVAP assay. Although *in vitro* synthesis of total Ig was observed in both untreated and PWM-treated cells (0.201 µg/ml and 0.513 µg/ml, respectively), the production of HIV-1-specific Ig was below the detection limit [23]. After a median time of 37 months (range 33–49 months) from therapy initiation, HIV-1-specific CD8⁺ T-cell responses were analysed in five HLA-A2* children using the EliSpot assay after therapy initiation (range 33–49 months). As shown in Table 3, one seronegative (EA02) and one seropositive child (EA06) did not show CD8⁺ T-cell responses to any of the 16 HIV-1-derived peptides examined. Two seronegative children (EA03 and EA05) and a seropositive child (EA01) showed a low response against few of the 16 tested HIV-1 peptides.

Therapy interruption

Therapy interruption was performed in one child (EA06) positive for HIV-1 DNA, HIV-1 mRNAs and HIV-1-specific antibodies and in one child (EA05) negative for HIV-1-specific immunity and with persistently undetectable levels of all viral parameters. In the EA06 seropositive child, rebound of plasma viraemia reached a peak of 5.18 log₁₀ copies/ml 12 weeks after therapy interruption and then persistently remained at 4.50 log₁₀ copies/ml during therapy interruption. Plasma viral rebound was preceded by an increase in proviral HIV-1 DNA and HIV-1 RNA_{in} (Figure 2A). In the EA05 seronegative child rebound of plasma viraemia was more rapid and higher than that observed in child EA06, reaching a peak of 5.90 log₁₀ copies/ml 4 weeks after therapy interruption. Of interest, this plasma viral rebound preceded an increase in HIV-1 DNA (peak of 87 copies/10⁵ PBMC), HIV-1 RNA_{in} (peak of 1,242 copies/10⁶ copies GAPDH) and HIV-1 RNA_{out} (peak of 820 copies/10⁶ copies GAPDH) in PBMCs (Figure 2A). Because of this rapid and high rebound of plasma viraemia, as well as the other cell-associated parameters, the therapy was immediately recommenced.

Sequence analyses disclosed no drug resistance mutations in viruses isolated from cells and plasma (data not shown). During therapy interruption, there was a slight decrease of CD4⁺ T-cells both in child EA05 (from 1,388 to 775 cells/µl) and in child EA06 (from 1,708 to 1,071 cells/µl), but CD4⁺ T-cell percentages remained consistently >25%. No variations in CD8⁺ T-cells were observed (data not shown). Both EA06 and EA05 were re-analysed for HIV-1-specific cellular immune response at 1 month and 6 months, respectively, after therapy re-initiation. As shown in Figure 2B, only child EA06 showed a cellular immune response against several HIV-1-derived peptides, while child EA05 remained negative.

Discussion

Perinatal HIV-1 infection is acquired in the milieu of a developing immune system, leading to high levels of uncontrolled viral replication; thus, infants experience rapid disease progression in the absence of ART [8,28,29]. A very early diagnosis and treatment during primary infection should decrease the magnitude of virus dissemination throughout the body, preserve immune functions, and thus reduce risk of clinical progression. However, the effect of early ART on the progression of perinatal HIV-1 infection was not well defined.

This study investigated the viral dynamics and immune responses of infants in whom antiretroviral therapy was initiated within the first 3 months of life. All infants were virological responders to therapy and, after the initial HIV-1 decline, plasma viraemia remained below the detection limits except for a few blips during the entire long-term follow-up period. This is in agreement with a previous observation that initiation of ART in the first three months of life resulted in improved long-term viral suppression [12]. Despite the fact that children were persistently aviraemic, HIV-1 DNA was consistently detected in the PBMCs of 4/6 children. This persistence may have originated from latently infected cells with a long half-life and/or newly infected cells [30,31]. Four of six children were persistently negative for markers of viral replication, HIV-1 RNA_{in} and HIV-1 RNA_{out}; nevertheless, this finding cannot exclude the presence of residual viral replication activity below the limits of detection.

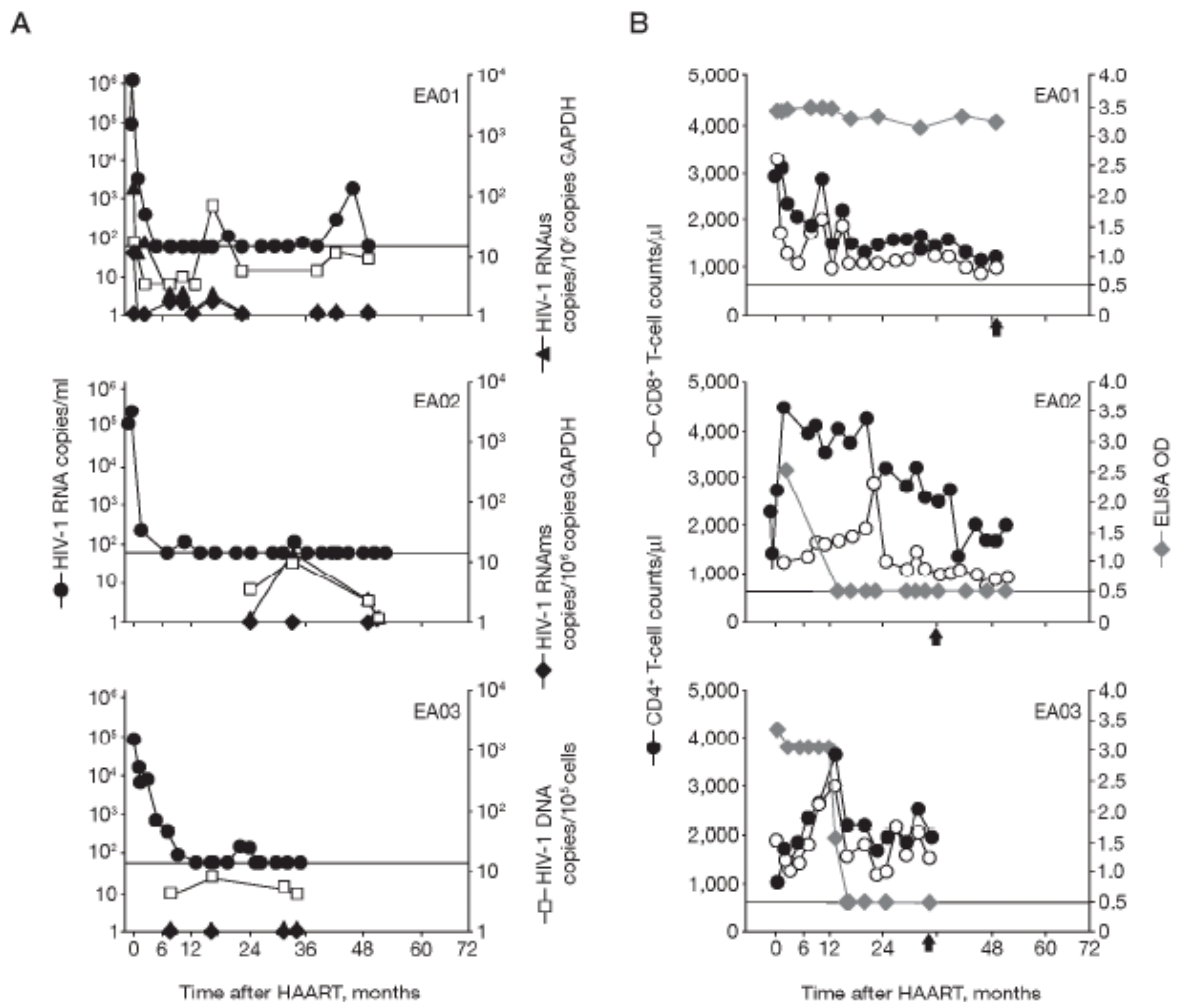
Of interest, only the two children with detectable viral mRNAs remained seropositive, while the others did not develop autochthonous HIV-1 antibodies and, after having lost maternal antibodies, remained HIV-1 seronegative. This finding extends previous observations [13,14]. In addition, we found that all children were negative for CD8⁺ T-cell responses against the majority of tested HIV-1 epitopes. The use of only HLA-A2-restricted peptides might have limited the detection of a CD8⁺ T-cell response; nevertheless, this approach allowed us to perform the analysis on 5/6 infants in our cohort. A recent report indicated that in adults early ART during primary infection was associated with long-term viral suppression, and in a few cases with incomplete humoral response to HIV-1 or seroreversion, probably due to the absence of ongoing antigenic stimulation required for maintaining HIV-1-specific humoral responses [32]. If the timing of treatment initiation is crucial to preserving the immune system in adults, the success of early viral suppression in infants who are immature immunologically is under debate [33]. The absence of HIV-1-specific humoral and cellular immune

responses in this study in early-treated children could reflect a lack of the appropriate (for duration and level) antigenic stimulus required by the developing immune system [34]. With this concern, a previous study performed on children who had commenced ART after 1 year of life indicated that the total CD8⁺ T-cell response was related to levels of plasma viraemia, and was greatest when viral load was 10³–10⁴ copies/ml plasma. In contrast, in the few studied children who initiated ART within 3 months of life, CD8⁺ T cell response was very poor, regardless of plasma viraemia levels [35]. This finding suggests

that ART initiation in the first months of life might alter the viral threshold required for the engagement of HIV-1-specific immune responses [35,36].

Analysis of the kinetics and magnitude of viral rebound in plasma and PBMCs after therapy interruption demonstrated a different response in the seropositive and seronegative child. In the seropositive child EA06 there was a rapid rebound of HIV-1 DNA and RNAus, indicating persistence in the peripheral blood compartment of infected cells where the virus had undergone replication immediately after therapy interruption. In the seronegative child EA05, the rebound of plasma

Figure 1. Virological and immunological profiles of infants during early antiretroviral therapy



(A) The kinetics of plasma HIV-1 RNA, HIV-1 DNA, HIV-1 unspliced RNAs (RNAus), and HIV-1 multiply spliced RNAs (RNAm) determined by real-time PCR in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The horizontal line represents the lower limit of detection of the assays for plasma HIV-1 RNA. (B) CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts and HIV-1-specific antibody levels determined by ELISA. The identification codes of patients are reported within each panel. The horizontal line represents the lower limit of detection of the assays for HIV-1-specific antibodies. The back arrow indicates the time point when the EISpot assay was performed. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HAART, highly active antiretroviral therapy; OD, optical density.

Figure 1. Continued

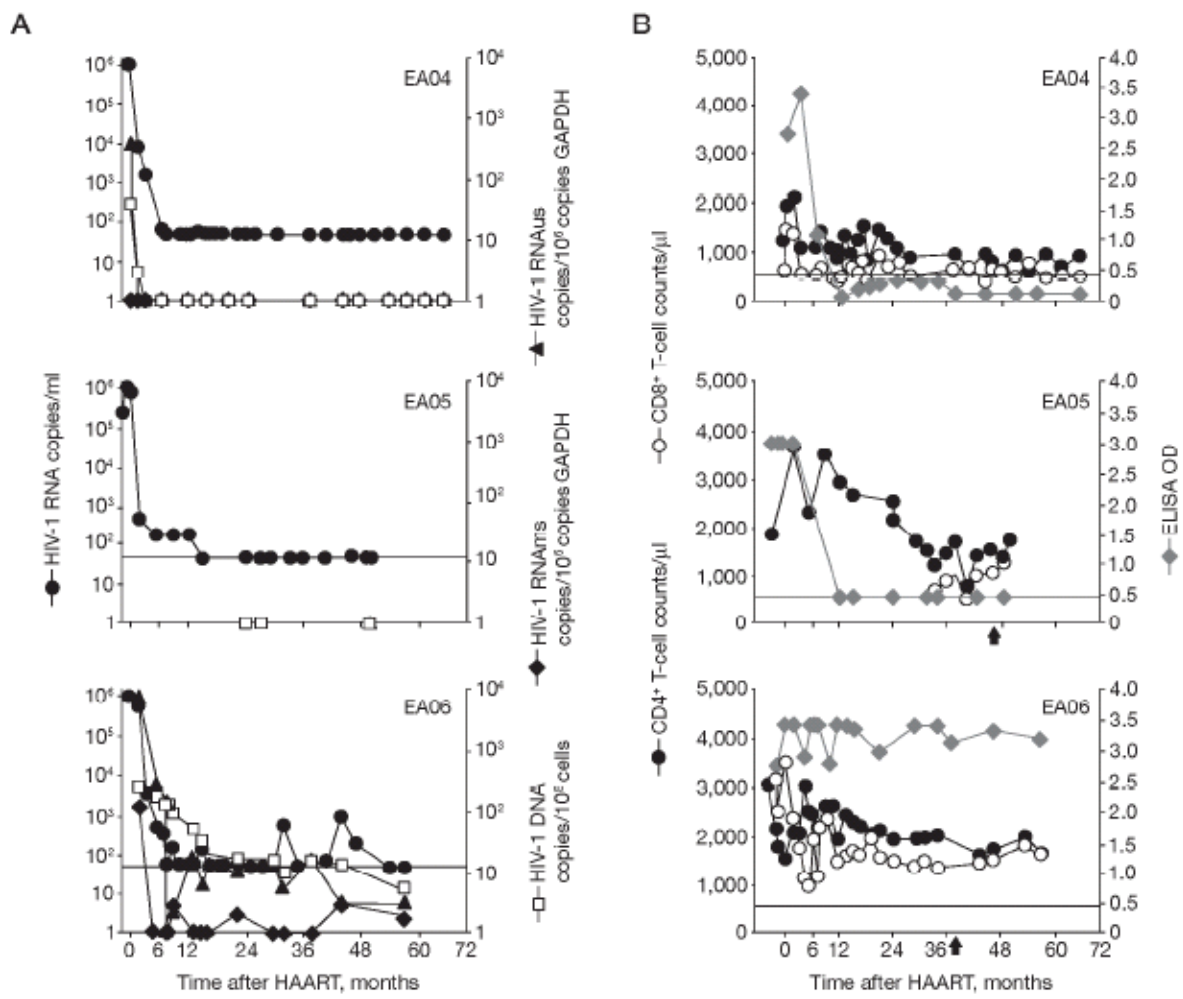
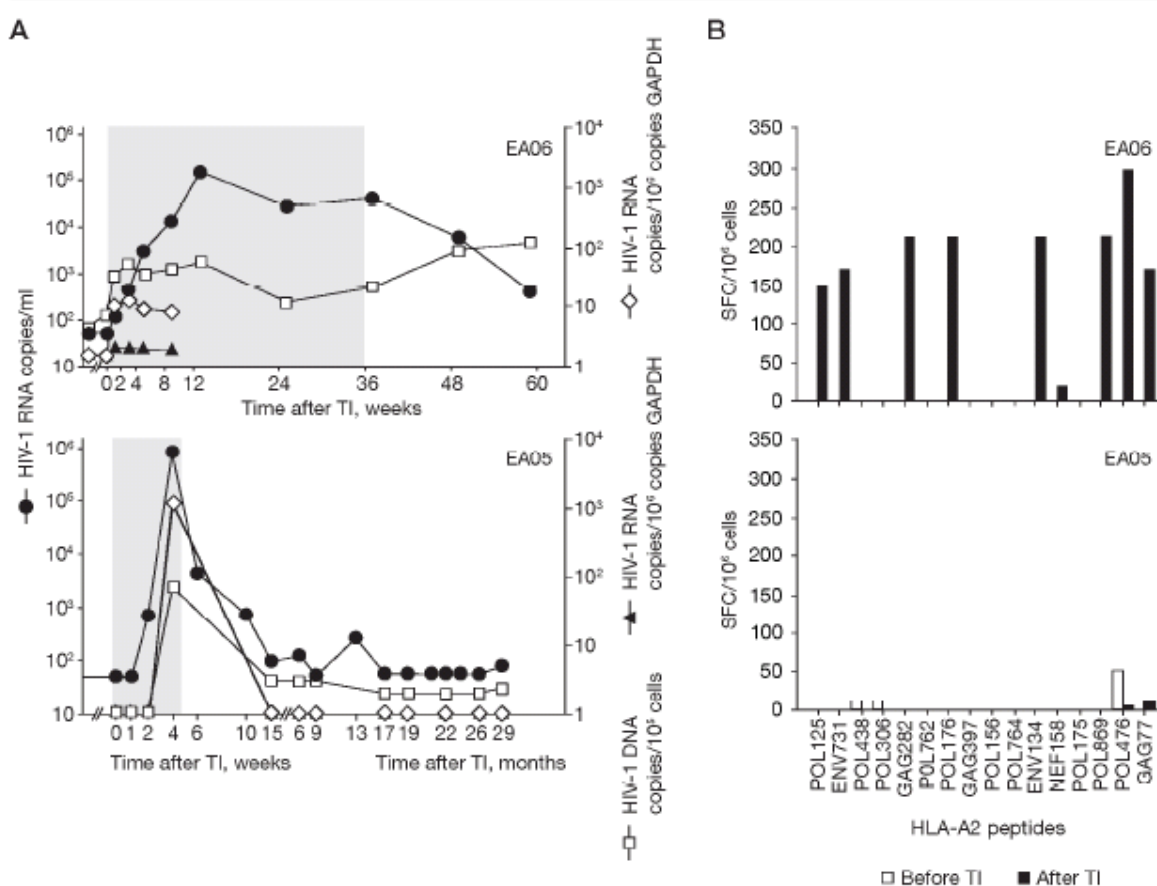


Table 3. HIV-1 peptide-specific CD8⁺ T-cell response in ART-treated children given as the total number of spot-forming cells (SFC)/10⁶ cells

Patient	HLA-A2 peptides															
	POL	ENV	POL	POL	GAG	POL	POL	POL	POL	POL	ENV1	NEF	POL	POL	POL	GAG
EA01 (49)*	-	-	-	-	-	-	215	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EA02 (33)*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EA03 (34)*	150	-	135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EA05 (38)*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	50	20
EA06 (37)*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Time points (in months) when the EISpot assay was performed.

Figure 2. Kinetics of viral replication during therapy interruption



(A) Change of plasma HIV-1 RNA, HIV-1 DNA, HIV-1 unspliced RNA (RNA_us), and HIV-1 multiply spliced RNA (RNA_ms) parameters in one seropositive (EA06) and one seronegative (EA05) HIV-1-infected child. The shaded area indicates the period of therapy interruption. (B) HIV-1 peptide responses determined by EISpot assay before (white columns) and after (black columns) therapy interruption. The results are expressed as spot-forming cells (SFC) per 10⁶ cells. TI, therapy interruption.

viraemia preceded the viral rebound in PBMCs, possibly indicating that latently infected cells were in other reservoirs than the peripheral blood compartment [37]. Interestingly, a cellular HIV-1-specific immune response occurred in the child who remained for 36 months in therapy interruption, but did not occur in the child that had only short-term therapy interruption. This further supports the idea that the magnitude and duration of viral antigen exposure are crucial for the onset of immune response against HIV-1. In both cases, however, plasma viraemia was controlled after therapy re-introduction.

In conclusion, early ART is associated with long-term control of viral replication and good clinical and immunological outcomes. However, finding that HIV-1 persisted in seronegative aviraemic children strongly confirms that early ART is unable to eradicate infection, while it may greatly impair virus-specific immune responses. These findings are important for planning

therapeutic strategies against HIV-1 in infants. Although the high grade of viral suppression suggests that simplified antiretroviral regimens may be sufficient to maintain long-term control of viral replication, the lack of immune response also suggests that therapy interruption in early treated infants might be preceded by therapeutic vaccination.

Acknowledgements

We thank Pierantonio Gallo for artwork and Lisa Smith for editorial assistance. This work was supported by ISS, Progetto AIDS Grant no. 45F.13 and no. 45G.12 and no. 30G.27.

Disclosure statement

The authors have no conflict of interest.

References

- Zhang L, Ramratnam B, Tenner-Racz K, *et al.* Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999; **340**:1605–1613.
- Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, *et al.* Persistence of HIV-1 transcription in peripheral blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999; **340**:1614–1622.
- Zanchetta M, Walker S, Burghel N, *et al.* Long-term decay of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reservoir in HIV-1-infected children treated with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2006; **193**:1718–1727.
- Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, *et al.* Latent infection of CD4⁺ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999; **5**:312–317.
- Chun TW, Fauci AS. Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:10958–10961.
- Ho DD. Dynamics of HIV-1 replication *in vivo*. *J Clin Invest* 1997; **112**:2565–2567.
- Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 1996; **50**:825–854.
- De Rossi A, Masiero S, Giaquinto C, *et al.* Dynamics of viral replication in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Invest* 1996; **97**:323–330.
- Lillo FB, Ciuffreda D, Veglia F, *et al.* Viral load and burden modification following early antiretroviral therapy of primary HIV-1 infection. *AIDS* 1999; **13**:791–796.
- Ngo-Giang-Huong N, Deveau C, Da Silva I, *et al.* Proviral HIV-1 DNA in subjects followed since primary HIV-1 infection who suppress plasma viral load after one year of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; **15**:665–673.
- Aboulker JP, Babiker A, Chaix ML, *et al.* Highly active antiretroviral therapy started in infants under 3 months of age: 72-week follow-up for CD4 cell count, viral load and drug resistance outcome. *AIDS* 2004; **18**:237–245.
- Luzuriaga K, McManus M, Mofeson L, Britto P, Graham B, Sullivan JL, for the PACTG 356 Investigators. A trial of three antiretroviral regimens in HIV-1 infected children. *N Engl J Med* 2004; **350**:2471–2480.
- Luzuriaga K, McManus M, Catalina M, *et al.* Early therapy of vertical human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: control of viral replication and absence of persistent HIV-1-specific responses. *J Virol* 2000; **74**:6984–6991.
- Hainaut M, Peltier CA, Goetghebuer T, *et al.* Seroreversion in children infected with HIV type 1 who are treated in the first months of life is not a rare event. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: 1820–1821.
- De Rossi A, Ometto L, Mammano F, Zanotto C, Giaquinto C, Chieco-Bianchi L. Vertical transmission of HIV-1: lack of detectable virus in peripheral blood cells of infected children at birth. *AIDS* 1992; **10**:1117–1120.
- Ometto L, De Forni D, Patiri F, *et al.* Immune reconstitution in HIV-1-infected children on antiretroviral therapy: role of thymic output and viral fitness. *AIDS* 2002; **16**:839–849.
- Ometto L, Zanotto C, Maccabrini A, *et al.* Viral phenotype and host-cell susceptibility to HIV-1 infection as risk factors for mother-to-child HIV-1 transmission. *AIDS* 1995; **9**:427–434.
- Hill CM, Deng H, Unutzman D, *et al.* Envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus can use human CCR5 as a coreceptor for viral entry and make direct CD4-dependent interactions with this chemokine receptors. *J Virol* 1997; **71**:6296–6304.
- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, *et al.* A new classification for HIV-1. *Nature* 1998; **391**:240.
- Paolucci S, Baldanti F, Campanini G, *et al.* Analysis of HIV drug-resistant quaspecies in plasma, peripheral blood mononuclear cells and viral isolates from treatment-naive and HAART patients. *J Med Virol* 2001; **65**:207–217.
- Shafer RW, Stevenson D, Chan B. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**:348–352.
- Indraccolo S, Zamarchi R, Veronese ML, *et al.* Standardization of *in vitro* synthesis and detection of HIV-1-specific antibodies. *J Immunol Methods* 1993; **157**:105–115.
- Zamarchi R, Barelli A, Borri A, *et al.* B cell activation in peripheral blood and lymphnodes during HIV infection. *AIDS* 2002; **16**:1217–1226.
- Propato A, Schiaffella E, Vicenzi E, *et al.* Spreading of HIV-specific CD8⁺ T-cell repertoire in long-term nonprogressors and its role in the control of viral load and disease activity. *Hum Immunol* 2001; **62**:561–576.
- The European Collaborative Study. Age-related standards for T lymphocyte subsets based on uninfected children born to human immunodeficiency virus 1-infected women. *Pediatr Infect Dis J* 1992; **11**:1018–1026.
- De Rossi A, Ades AE, Mammano F, *et al.* Antigen detection, virus culture, polymerase chain reaction, and *in vitro* antibody production in the diagnosis of vertically transmitted HIV-1 infection. *AIDS* 1991; **5**:15–20.
- De Rossi A, Ometto L, Mammano F, *et al.* Time course of antigenaemia and seroconversion in infants with vertically acquired HIV-1 infection. *AIDS* 1993; **7**:1528–1529.
- Children born to women with HIV-1 infection: natural history and risk of transmission. European Collaborative Study. *Lancet* 1991; **337**:253–260.
- Schacker TW, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 1998; **128**:613–620.
- Siliciano JD, Siliciano RF. Latency and viral persistence in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 2000; **106**:823–825.
- Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4⁺ T cells. *Nat Med* 2003; **9**:727–728.
- Kassutto S, Johnston MN, Rosenberg ES. Incomplete HIV type 1 antibody evolution and seroreversion in acutely infected individuals treated with early antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2005; **40**:868–873.
- Sharland M, Blanche S, Castelli G, Ramos J, Gibb DM; Penta Steering Committee. Penta guidelines for the use of antiretroviral therapy, 2001. *HIV Med* 2001; **5** Suppl 2:61–86.
- Sandberg JK, Fast NM, Jordan KA, *et al.* HIV-specific CD8⁺ T cell function in children with vertically acquired HIV-1 infection is critically influenced by age and the state of the CD4⁺ T cell compartment. *J Immunol* 2003; **170**:4403–4410.
- Borkowsky W, Zhan MX, Chen SH, *et al.* Correlation between HIV-specific CD8 cell production of interferon- γ and plasma levels of HIV RNA in perinatally infected pediatric populations. *J Infect Dis* 2004; **190**:722–726.
- Jurriaans S, Sankatsing SU, Prins JM, *et al.* HIV-1 seroreversion in an HIV-1-seropositive patient treated during acute infection with highly active antiretroviral therapy and mycophenolate mofetil. *AIDS* 2004; **18**:1607–1608.
- Fischer M, Joos B, Hirschel B, Bleiber G, Weber R, Gunthard HF; Swiss HIV Cohort Study. Cellular viral rebound after cessation of potent antiretroviral therapy predicted by levels of multiply spliced HIV-1 RNA encoding nef. *J Infect Dis* 2004; **190**:1979–1988.

Accepted for publication 6 September 2007