



Il ruolo degli acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali di pazienti gravide sieropositive

Melissa Carrara¹, Barbara Gardella¹, Marianna Roccio¹, Anna Maccabruni²,
Bianca Mariani², Lucia Panzeri¹, Francesca Zara³, Arsenio Spinillo¹

¹Clinica OstetricoGinecologica, ²Clinica di Malattie Infettive, Università degli Studi di Pavia,
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, e ³Dipartimento di Microbiologia,
Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italia

Il ruolo degli acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali di pazienti gravide sieropositive

Obiettivo: lo scopo di questo studio è di valutare la presenza del virus HIV-1 nelle secrezioni cervicovaginali di donne sieropositive gravide rispetto a donne sieropositive non gravide.

Materiali e metodi: abbiamo messo a confronto 43 pazienti gravide sieropositive con 241 pazienti sieropositive non gravide di età simile (± 2 anni). Nelle pazienti gravide i campioni ematici e cervicovaginali sono stati ottenuti in ciascun trimestre di gravidanza. Nei soggetti di controllo gli stessi campioni sono stati raccolti all'atto dell'arruolamento. HIV-1 RNA è stato misurato nel plasma; HIV-1 DNA provirale, trascritti di HIV-1 RNA intracellulare e HIV-1 RNA libero sono stati raccolti nelle secrezioni cervicovaginali mediante competitive polymerase chain reaction (cRT-PCR) e reverse transcriptase PCR.

Risultati: lo shedding genitale di HIV-DNA (22/43 confrontati con 79/241, $p=0.02$) e l'identificazione di HIV-RNA libero (26/43 confrontati con 72/241, $p<0.001$) è più comune nelle pazienti al primo trimestre di gravidanza rispetto alle non gravide. La gravidanza correla con una significativa tendenza all'aumento della carica virale cervicovaginale, intesa come HIV-DNA (Spearman Rho =0.149, $p=0.012$), HIV-RNA libero (Spearman Rho =0.253, $p<0.001$), ma non trascritti di HIV-RNA (Spearman Rho =0.06, $p=0.31$). Correggendo per i fattori confondenti, le percentuali di identificazione a livello genitale di HIV-DNA (odds ratio =1.94, 95% confidence interval =1.01-3.78) e HIV-RNA libero (odds ratio =4.07, 95% confidence interval =1.97-8.41) sono più elevate nelle donne al primo trimestre di gravidanza, rispetto alle pazienti non gravide.

Conclusioni: la carica virale cervicovaginale è aumentata nelle pazienti sieropositive gravide, rispetto alle non gravide, anche nelle donne con viremia non rilevabile. In questa popolazione sieropositiva a basso rischio, i rischi di trasmissione verticale ed orizzontale non dovrebbero essere sottovalutati.

The role of HIV-related nucleic acids in cervicovaginal secretions of seropositive pregnant women

Objective: the purpose of this study was to evaluate the presence of HIV-1 in cervicovaginal secretions of pregnant as compared to non-pregnant HIV-seropositive women.

Patients and methods: we compared 43 known HIV seropositive pregnant patients versus 241 age-matched (± 2 years) control non-pregnant HIV-seropositive subjects. In pregnant patients blood and cervicovaginal samples were obtained during each trimester of pregnancy. In control subjects the same samples were obtained at enrolment. HIV-1 RNA was measured in plasma; proviral HIV-1 DNA, cell-associated and cell-free HIV-1 RNA in cervicovaginal secretion by competitive polymerase chain reaction (cRT-PCR) and reverse transcriptase PCR.

Results: the genital shedding of HIV-DNA (22/43 as compared to 79/241, $p=0.02$), and cell-free HIV-RNA detection (26/43 as compared to 72/241, $p<0.001$) was more common in first-trimester pregnant than in non pregnant women. Pregnancy correlated with a significant positive trend in the cervicovaginal load of HIV-DNA (Spearman Rho =0.149, $p=0.012$), and cell-free HIV-RNA (Spearman Rho =0.253, $p<0.001$), but not of HIV-RNA transcripts (Spearman Rho =0.06, $p=0.31$). After correction for potential confounders, first-trimester pregnant women had increased rates of genital HIV-DNA (odds ratio =1.94, 95% confidence interval =1.01-3.78) and cell-free HIV-RNA (odds ratio =4.07, 95% confidence interval =1.97-8.41) detection compared to nonpregnant controls.

Conclusion: the shedding of genital HIV was increased in pregnant compared to non pregnant subjects, even in patients with undetectable viremia. In this low-risk HIV-positive population the risks of vertical or horizontal transmissions should not be underestimated.

Introduzione

La trasmissione materno-fetale dello Human Immunodeficiency Virus (HIV) di tipo 1 è diventata un evento raro nei paesi industrializzati, mentre rappresenta tutt'ora una delle maggiori cause di morbidità e mortalità infantile nei paesi in via di sviluppo [1]. Diversi studi dimostrano che, in assenza di allattamento materno, la trasmissione perinatale avviene principalmente durante il travaglio e l'espletamento del parto, per contatto diretto con il virus nel tratto genitale femminile [2].

La relazione tra la secrezione genitale dell'HIV e la frequenza di infezione neonatale non è ancora stata approfondita in modo adeguato. Una miglior comprensione dei meccanismi che regolano la presenza del virus nelle secrezioni cervicovaginali di donne gravide è necessaria per programmare misure preventive per diminuire il rischio di trasmissione verticale dell'infezione [2-3].

Sulla base di studi precedenti [4,5], l'American College of Obstetricians and Gynecologists raccomanda che le donne gravide sieropositive per HIV con carica virale plasmatica >1000 copie/mL vengano adeguatamente informate riguardo ai benefici del taglio cesareo elettivo [6]. Questa raccomandazione è basata sull'ipotesi che l'esposizione all'HIV nel canale del parto potrebbe facilitare la trasmissione verticale e che il taglio cesareo potrebbe prevenire l'infezione neonatale, limitando il contatto con il sangue e le secrezioni genitali materne. Dall'introduzione di queste Linee Guida, la percentuale di parti addominali operativi tra donne gravide sieropositive è aumentata significativamente. Le Linee Guida del Royal College of Obstetricians and Gynecologists di giugno 2010 sottolineano l'importanza del taglio cesareo elettivo in donne gravide con carica virale plasmatica >50 copie/mL o che assumono ZDV come monoterapia o con coinfezione da HCV [7]. D'altro canto, dati provenienti da recenti studi, supportano l'opzione di un parto vaginale programmato per quelle donne gravide con carica virale plasmatica <50 copie/mL e che assumono la terapia antiretrovirale (HAART) [8-9]. Il meccanismo biologico di trasmissione perinatale del virus HIV tra donne in terapia con HAART e con una carica virale plasmatica bassa o assente non è chiaro [6]. In queste donne l'effetto protettivo del taglio cesareo sulla trasmissione verticale è dubbio. Sebbene molti studi abbiano mostrato una correlazione tra carica virale plasmatica e carica virale genitale, i fattori che regolano la secrezione cervicovaginale dell'HIV nelle donne gravide e la relazione tra la carica virale nelle secrezioni cervicovaginali e la trasmissione verticale non sono ancora chiari.

Scopo del lavoro

L'obiettivo di questo lavoro è studiare quei fattori associati alla presenza dell'HIV-1 nelle secrezioni cervicovaginali di donne sieropositive gravide, rispetto alle donne non gravide, valutando, inoltre, le differenze della carica virale cervicovaginale nei tre trimestri di gravidanza e la loro relazione con la trasmissione verticale del virus HIV.

Materiali e metodi

Da gennaio 2004 a dicembre 2009, 45 pazienti sieropositive per HIV, seguite in gravidanza presso la Clinica di Ostetricia e Ginecologia della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, sono state arruolate in uno studio prospettico per valutare il passaggio del virus HIV nelle secrezioni genitali durante la gravidanza. Al fine di confrontare la percentuale di tali secrezioni tra donne gravide e non gravide, sono state arruolate 251 donne di età simile (differenza massima di ± 2 anni) sieropositive non gravide, che hanno usufruito del Servizio di Citologia/Colposcopia della stessa Clinica per il periodico screening contro la neoplasia cervicale.

Il protocollo di studio è stato esaminato e approvato dal Comitato Etico della Fondazione. Tutte le donne hanno dato il loro consenso informato alla partecipazione allo studio e sono state raccolte informazioni demografiche, cliniche e sessuali mediante un questionario standard.

Nelle pazienti gravide i campioni ematici e cervicovaginali sono stati ottenuti durante il primo (12-14 settimane), secondo (21-24 settimane) e terzo trimestre (34-36 settimane) di gestazione. Gli stessi campioni sono stati prelevati dai controlli al momento dell'arruolamento.

Per le pazienti gravide è stato programmato il parto per taglio cesareo elettivo alla 39^a settimana di gravidanza. La profilassi della trasmissione intrapartum del virus HIV è stata eseguita mediante infusione endovenosa di Zidovudina, cominciata 4 ore prima del parto e continuata sino al clampaggio del cordone ombelicale. La valutazione di laboratorio dei nati da madri sieropositive include esami sierologici (ELISA e Western Blot) e virologici (identificazione di HIV-DNA in cellule mononucleate del sangue periferico tramite PCR, colture virali) eseguiti alla nascita e a 1, 3, 6, 12 e 18 mesi di vita. Questi bambini vengono definiti non infetti quando gli esami sierologici e virologici risultano negativi a 12 mesi di vita [10].

Ad ogni visita sono stati prelevati campioni di sangue periferico per valutare la conta di linfociti CD4+ e per quantificare HIV-1 RNA nel plasma. Le secrezioni cervicovaginali, per l'identificazione di acidi nucleici HIV-correlati, sono state raccolte facendo ruotare delicatamente un tampone in Dacron nel fornice vaginale posteriore e mediante *washing* vaginale (dopo inserimento di 10 ml di soluzione RPMI-1640, si attende un minuto per l'accumulo, e si procede all'aspirazione della sospensione). I tamponi sono stati usati per ricercare l'HIV-1 RNA libero, mentre l'HIV-DNA provirale ed i trascritti di HIV-RNA intracellulari sono stati rilevati dai campioni dei lavaggi. All'arrivo in laboratorio e ancora dopo la centrifugazione, i campioni vengono esaminati al microscopio per confermare l'assenza di globuli rossi e spermatozoi. La possibile presenza di contaminazione ematica viene ulteriormente controllata utilizzando un test di screening di routine per l'identificazione dell'emoglobina (reactive strips, Bayer, multistric-10 visual). Una descrizione dettagliata dei metodi utilizzati per identificare e quantificare gli acidi nucleici HIV-correlati nei campioni ematici e cervicovaginali, includendo anche procedure di validazione, è stata riportata altrove [11]. I tamponi vengono incubati in 1 ml di soluzione RPMI-1640 e centrifugati. Il supernatante viene usato per estrarre HIV-1 RNA libero. HIV-1 DNA è invece estratto dai nuclei delle cellule cervicovaginali per minimizzare la contaminazione con DNA non integrato. L'RNA viene estratto dai campioni cervicovaginali e plasmatici, utilizzando il metodo

tiocianato di guanidina [12]. I seguenti substrati sono analizzati utilizzando la quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) e la reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR):

1. HIV-1 RNA genomico dal plasma e dalle secrezioni cervicovaginali senza cellule;
2. trascritti di HIV-1 RNA unspliced virus-specifici da cellule cervicovaginali;
3. HIV-1 DNA provirale da nuclei cervicovaginali.

L'analisi quantitativa delle sequenze specifiche di RNA e DNA viene eseguita inizialmente con la PCR, usando la coppia di primers SK 426/431 [12]. I campioni di RNA sono stati retrotrascritti impiegando 100 U di trascrittasi inversa del virus leucemico murino Moloney (RT, Gibco Life Technologies, Paisley, UK), 20 pmol del primer SK 431, 0.2 mM di desossinucleotidi trifosfati (dNTP), e 20 U di Rnasin (Gibco Life Technologies). Il DNA viene successivamente amplificato utilizzando 50 pmol di primers SK 462 e SK 431, 1.5 U di Taq-DNA polimerasi (Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, California, USA). La quantificazione di HIV-1 DNA ed RNA è stata effettuata usando una PCR competitiva ed una RT-PCR, come descritto da Menzo et al. [13].

Per i campioni cervicovaginali, i risultati quantitativi sono espressi come numero di trascritti di HIV-1 RNA e numero di copie di HIV-1 DNA per 10^5 cellule e come numero di copie di HIV-1 RNA libero per mL di secrezioni cervicovaginali. Il fattore di diluizione del campione cervicovaginale con la quantità nota di soluzione di trasporto (1 mL/campione da tampone) è preso in considerazione per il calcolo finale del numero di copie di HIV-1 RNA libero. Ogni campione proveniente da tampone contiene da 200 a 300 μ L di lavaggio cervicovaginale. Nelle condizioni del nostro studio, il limite inferiore di identificazione del saggio è di 2 copie di DNA o RNA/ 10^5 cellule, 20 copie di RNA/mL di secrezioni cervicovaginali, e 200 copie di RNA/mL di plasma.

I casi e i controlli sono stati esaminati mediante il χ^2 test e il Mann-Whitney U test per confrontare rispettivamente le variabili categoriche e continue. Lo Spearman Rank correlation coefficient è stato usato per valutare la tendenza. Per stimare la probabilità di identificazione del virus HIV nelle secrezioni cervicovaginali, corretta per i potenziali fattori confondenti, sono stati calcolati l'odds ratio e il 95% confidence interval attraverso la multinomial logistic regression analysis. Il Friedman non parametric Anova è stato impiegato per valutare le differenze della carica virale cervicovaginale nei tre trimestri di gestazione.

Risultati

Due pazienti gravide e 10 non gravide non hanno accettato di partecipare allo studio, per cui sono state escluse dall'analisi. Quindi, la popolazione finale risulta composta da 43 casi e 241 controlli.

L'età media al momento dell'arruolamento è di 31.6 anni (4.5 SD) nelle donne gravide e 31.9 anni (5.1 SD) nei soggetti di controllo ($P=0.7$). L'epoca gestazionale media al momento dei campionamenti è rispettivamente di 12.9 settimane (0.8 SD) durante il primo trimestre, 22.4 settimane (1.3 SD) nel secondo e 35.3 (1.7 SD) nel terzo trimestre. Le caratteristiche principali delle pazienti all'atto dell'arruolamento sono riportate in tabella 1. Le donne gravide hanno le medesime caratteristiche demografiche dei soggetti di controllo, così come la viremia non rilevabile o la bassa conta dei linfociti CD4+. La terapia antiretrovirale al momento dell'arruolamento comprende o 2 inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI) (5 casi e 44 controlli) o 3 farmaci comprendenti almeno 2 NRTI e 1 inibitore delle proteasi (37 casi e 197 controlli). Solo una paziente gravida con una recente infezione da HIV ha rifiutato ogni terapia antiretrovirale, sottoponendosi ad una sola visita (nel primo trimestre di gravidanza) prima del parto. Tra i metodi contraccettivi usati dalle donne di controllo sono da annoverare estrogeni orali (45 soggetti, 18.7%) e dispositivi intrauterini (8 soggetti, 3.3%). L'utilizzo del condom viene riportato da

120 (49.8%) donne non gravide e 8 (18.6%) gravide ($p<0.001$). Complessivamente, le vaginosi batteriche sono state diagnosticate in 18 (41.8%) casi e 65 (27%) controlli ($p=0.05$).

Nell'insieme, le percentuali di HIV-DNA (49/101 confrontato con 52/183, $p<0.001$), di trascritti di HIV-RNA (38/101 confrontato con 38/183, $p=0.002$) e di HIV-RNA libero (44/101 confrontato con 54/183, $p=0.017$) ricercati nelle secrezioni cervicovaginali sono più alti tra le donne con viremia plasmatica rilevabile rispetto alle donne con viremia non rilevabile. Sebbene le percentuali complessive di viremia plasmatica non rilevabile siano simili nei due gruppi, la frequenza di viremia <500 copie/mL è più bassa nelle donne gravide rispetto ai controlli (24/43 confrontato con 182/241, $p=0.015$). Nelle donne gravide con viremia plasmatica non rilevabile la percentuale di HIV-DNA nelle secrezioni cervicovaginali è di 56.5% (13/23), quella dei trascritti di HIV-RNA è 21.7% (5/23) e quella di HIV-RNA libero è 43.5% (10/23). I valori corrispondenti tra le donne di controllo sono 24.4% (39/160, $p=0.003$ confrontato con le donne gravide) per HIV-DNA, 20.1% (33/160, $p=0.9$ confrontato con le donne gravide) per i trascritti di HIV-RNA e 27.5% (44/160, $p=0.14$ confrontato con le donne gravide) per HIV-RNA libero (Figura 1). Tra le donne gravide con viremia plasmatica rilevabile, le percentuali di isolamento di HIV-DNA, di trascritti di HIV-RNA e di HIV-RNA libero a livello delle secrezioni cervicovaginali sono rispettivamente 45% (9/20), 40% (8/20) e 80% (16/20). Nei soggetti di controllo le percentuali corrispondenti sono 45% (40/81, $p=0.8$), 37% (30/81, $p=0.8$) e 34.5% (28/81, $p<0.001$) (Figura 2).

La gravidanza risulta associata alla tendenza all'aumento della carica di HIV-DNA cervicovaginale (Spearman Rho =0.149, $p=0.012$) e di HIV-RNA libero (Spearman Rho =0.253, $p<0.001$), ma non dei trascritti di HIV-RNA (Spearman Rho =0.06, $p=0.31$). Inoltre, le vaginosi batteriche risultano correlate positivamente con la carica di HIV-RNA libero nelle secrezioni cervicovaginali (Spearman Rho =0.127, $p=0.032$). La tabella 2 riporta la percentuale di acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali delle donne gravide e non gravide all'atto dell'arruolamento. Nell'analisi univariata, le percentuali di riscontro di HIV-DNA (22/43 contro 79/241, $p=0.02$) e di HIV-RNA libero (26/43 contro 72/241, $p<0.001$) sono risultate più frequenti nelle gravide rispetto ai soggetti di controllo. Al fine di correggere potenziali fattori confondenti, è stata costruita un'equazione di regressione logistica multinomiale che include l'identificazione di acidi nucleici HIV-correlati nel secreto cervicovaginale tra le variabili di outcome, mentre la gravidanza (si, no), le vaginosi batteriche (si, no), contraccezione (nessuna, orale, IUD, condom) e la carica virale plasmatica <500 copie/mL (si, no) tra le variabili esplicative. Anche dopo l'adeguamento per i fattori confondenti, la gravidanza risulta associata ad un'aumentata probabilità d'identificazione di HIV-DNA e HIV-RNA libero nelle secrezioni cervicovaginali. Una carica virale plasmatica <500 copie/mL è correlata ad una riduzione della probabilità di rilevamento di HIV-DNA (odds ratio =0.85, 95% confidence interval=0.33-0.99, $p=0.044$) e di HIV-RNA libero (odds ratio =0.34, 95% confidence interval=0.19-0.6, $p<0.001$).

La tabella 3 mostra le percentuali di rilevamento degli acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali delle pazienti gravide nei tre trimestri studiati. Sia il χ^2 test che la Friedman non parametric Anova suggeriscono che i livelli cervicovaginali degli acidi nucleici HIV-correlati non cambia significativamente durante la gravidanza. Gli Spearman Rank correlation coefficient che associano la carica virale cervicovaginale di HIV-DNA (Spearman Rho =0.104, $p=0.28$), dei trascritti di HIV-RNA (Spearman Rho =0.016, $p=0.87$) e di HIV-RNA libero (Spearman Rho =0.023, $p=0.78$) con i trimestri di gestazione non sono ancora significativi. Quarantuno donne gravide (95.3%) sono state sottoposte a taglio cesareo e hanno ricevuto l'infusione di Zidovudina durante il parto. Ad 1 anno di follow-up, solo un bambino (2.3%) è risultato infetto dal virus HIV. Questo bambino è nato da madre con infezione virale recente, che era stata visitata solo alla 13^a settimana di gestazione, aveva rifiutato la terapia antiretrovirale, poi era stata persa nel follow-up. Ricoverata successivamente alla 37^a settimana di gravidanza per insorgenza di travaglio di parto spontaneo, è stata sottoposta a taglio cesareo. Alla visita del primo trimestre, la

viremia plasmatica della paziente era risultata molto elevata (39,000 copie/mL) e le secrezioni cervicovaginali positive per HIV-DNA (500 copie/10⁵ cellule) e per HIV-RNA libero (700 copie/mL).

Discussione

Diversi studi dimostrano una forte correlazione tra la carica virale plasmatica e cervicovaginale [14-16]. Secondo Kovacs et al. [14] la concentrazione plasmatica di HIV-RNA è il fattore più importante nel predire lo shedding genitale del virus HIV-1, anche tra le donne che assumono HAART. I nostri risultati confermano che la presenza di livelli plasmatici rilevabili di HIV-RNA è un fattore di rischio significativo nel predire la carica virale genitale. Dati precedenti suggeriscono che donne con HIV-RNA plasmatico non rilevabile potrebbero presentare persistentemente il virus HIV nelle secrezioni cervicovaginali, rimanendo infettive almeno a livello individuale [17].

In questo studio abbiamo ricercato diversi acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali. Questo approccio è stato scelto per avere una migliore visione complessiva dello shedding virale genitale. L'identificazione di HIV-DNA provirale rappresenta la presenza di cellule infettate dal virus nelle secrezioni cervicovaginali, mentre i trascritti di HIV-RNA sono un marker di attiva replicazione virale a livello genitale [18]. Sebbene l'HIV-1 RNA, rispetto all'HIV-1 DNA provirale, rappresenti più accuratamente il virus in replicazione, la possibile fonte di HIV-1 RNA che origina nel tratto genitale femminile non è ancora stata pienamente definita. Studi immunologici hanno dimostrato la presenza di differenze significative nella frequenza delle varianti degli epitopi dei linfociti T citotossici tra le quasispecie di HIV in diversi compartimenti dell'organismo, dovuta alla differente pressione immunologica nei diversi distretti [17, 19-20]. I risultati di questo studio suggeriscono che la gravidanza è associata all'aumento delle percentuali di identificazione degli acidi nucleici HIV-correlati a livello cervicovaginale. Nell'analisi multivariata, l'effetto netto della gravidanza sullo shedding virale genitale risulta indipendente dalla viremia plasmatica.

Rispetto alle donne non gravide, l'aumentata carica cervicovaginale di HIV-RNA libero e, in minor misura di HIV-DNA, è già evidente durante il primo trimestre di gravidanza. In più, valutazioni seriate degli acidi nucleici HIV-correlati nei tre trimestri di gravidanza indicano come la carica virale cervicovaginale non si modifichi con l'età gestazionale. La circolazione locale e la modificazione dei fattori di permeabilità tipici della gravidanza, un aumentato numero di linfociti infetti latenti, o anche un'aumentata espressione di HIV nelle mucose genitali possono spiegare questi risultati. È stato dimostrato che un aumento di acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali è associata ad un numero più elevato di leucociti nel tratto genitale [21]. Tuttavia, nel nostro studio non è stata analizzata la quantità di linfociti nei lavaggi vaginali. L'aumento della carica genitale di DNA provirale e di RNA libero nelle pazienti gravide potrebbe essere il risultato dell'incremento delle secrezioni cervicovaginale o dell'incremento della vascolarizzazione locale tipica della gravidanza [22]. Percentuali aumentate di ectopia cervicale, modificazioni del pH delle secrezioni cervicovaginali, la circolazione locale o i fattori di permeabilità associati alla gravidanza potrebbero influire sulla presenza e la carica dell'HIV nel tratto genitale femminile [23]. La modificazione del background ormonale a livello genitale associata alla gravidanza potrebbe anche essere influenzata dalla presenza e dalla replicazione dell'HIV nel tratto genitale femminile. Studi sperimentali su un modello di macacus Rhesus dimostra che il progesterone aumenta sia il rischio di acquisizione del virus, sia lo shedding virale genitale [24]. Durante la gravidanza le concentrazioni di estradiolo e progesterone sierico aumentano stabilmente, raggiungendo livelli da 10 a 100 volte superiore rispetto ai livelli raggiunti durante un normale ciclo mestruale [25]. Inoltre, sin dall'inizio della gravidanza, l'epitelio vaginale

non cambia come nel normale ciclo mestruale e questo potrebbe essere associato alla mancata differenza nello shedding virale nei tre trimestri di gestazione. Gli ormoni riproduttivi possono influire sul livello di replicazione virale o sul numero di cellule infette in duplicazione a livello della mucosa genitale. Essi possono agire sia direttamente, legando la sequenza regolatoria dell'HIV e up-regolando l'espressione del virus, o indirettamente, regolando la risposta immuno-mediata [26-27]. Sebbene siano stati fatti diversi sforzi per correggere i risultati per i fattori confondenti, è necessario descrivere i potenziali bias di questo studio. Con poche eccezioni, i soggetti arruolati sono donne inserite in un programma di follow-up a lungo termine, con bassi livelli di viremia plasmatica, bassi livelli di esposizione a malattie sessualmente trasmesse e di complicanze associate all'infezione da HIV. Per queste ragioni, i nostri risultati non possono essere estesi a popolazioni con elevata viremia plasmatica o complicazioni associate ad immunodeficienza. Studi precedenti hanno mostrato che le vaginosi batteriche sono associate ad un aumento nella carica virale genitale [28-29]. Infatti, le infezioni batteriche sono associate ad espressione di HIV-RNA nel tratto genitale femminile e inducono condizioni proinfiammatorie nelle cellule, quali secrezione di TNF alfa ed espressione di TLR2 e TLR4 mRNA, che in ultimo stimolano i linfociti CD2 ed inducono l'espressione del virus [30]. Nel nostro studio, le vaginosi batteriche sono più comuni nelle donne gravide rispetto alle non gravide. Quindi abbiamo inserito tale variabile tra i potenziali confondenti nell'analisi multivariata. Il regolare utilizzo di metodi contraccettivi di barriera riducono il rischio di acquisizione del virus HIV [31-32]. Nel presente lavoro, le pazienti non gravide riferiscono un utilizzo consistentemente maggiore del condom rispetto alle donne gravide. Il ruolo della contraccezione ormonale sulla carica virale genitale è controverso. Ad oggi, studi riguardanti tale problema hanno dato risultati contrastanti, andando da un ruolo protettivo degli estrogeni orali sulla possibilità di una donna di acquisire il virus HIV, passando attraverso un mancato effetto, sino ad un aumentato rischio di acquisizione [33-35]. L'introduzione del tipo di contraccettivo come fattore confondente in un modello di regressione logistica non altera l'effetto promuovente della gravidanza sullo shedding virale cervicovaginale. L'analisi multivariata dei nostri dati supporta l'ipotesi che l'effetto della gravidanza sia indipendente da potenziali fattori confondenti, quali la viremia plasmatica, la conta dei linfociti CD4, i partner HIV positivi, le vaginosi batteriche e la Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). Molti studi hanno posto l'attenzione sui fattori associati alla trasmissione durante l'ultimo periodo della gravidanza e nel periodo peripartum, come la carica virale plasmatica al momento del parto, anche se non riflettono esattamente il livello di replicazione dell'HIV nel tratto genitale femminile. Studi precedenti hanno dimostrato la presenza di shedding virale, sia in uomini che in donne che assumono terapia HAART, con viremia plasmatica, intesa come livello di HIV-RNA ematico, non rilevabile [36]. Nella nostra analisi, il 25-45% di donne con viremia plasmatica non rilevabile risultano positive alla ricerca di acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali. La terapia HAART non porta alla completa eradicazione del virus e, in pazienti con viremia non rilevabile, bassi livelli di replicazione virale possono essere costantemente isolati in diversi compartimenti dell'organismo [37]. È anche possibile che gli effetti dei farmaci possano variare nei diversi tessuti, portando a differente replicazione tra sangue e tratto genitale. Recenti studi riportano che l'HIV-RNA può essere isolato nelle secrezioni genitali del 35% delle pazienti in terapia HAART dopo 28 giorni di trattamento e nel 5% dopo 18 settimane [37]. Inoltre, come dimostrato nella coorte perinatale francese, la viremia plasmatica fallisce nel predire l'infettività delle secrezioni genitali [38]. Al momento, la carica plasmatica materna di HIV è l'unico fattore fortemente associato a trasmissione verticale residua. Donne gravide in terapia antiretrovirale con HIV-RNA plasmatico basso o non rilevabile hanno un rischio molto basso di trasmettere l'infezione da HIV al prodotto del concepimento [39-40]. In particolare, la percentuale di trasmissione materno-fetale è 0.4% in donne con viremia plasmatica <50 copie/mL [8, 38]. Secondo le Linee Guida Europee e Americane la carica di HIV plasmatica do-

rebbe anche essere utilizzata per valutare il rischio di trasmissione intrapartum dell'infezione e per decidere sulle modalità di espletamento del parto, valutando il ruolo del taglio cesareo elettivo come misura preventiva contro la trasmissione verticale [7, 41]. Secondo Chachoowang [42], nelle donne gravide con viremia plasmatica soppressa ed elevati livelli di carica virale nelle secrezioni cervicovaginali, il rischio di trasmissione materno-fetale aumenta di 15 volte, mentre nelle pazienti con elevata viremia plasmatica e shedding virale genitale soppresso, il rischio è minore.

In conclusione, i risultati del presente studio suggeriscono che in una popolazione di donne sieropositive per HIV con bassi livelli di viremia plasmatica, la carica virale cervicovaginale è maggiore nelle gravide rispetto alle non gravide. Dal 25 al 30% di donne con viremia plasmatica non rilevabile risulta positiva alla ricerca degli acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni genitali, sostenendo che anche in questa popolazione sieropositiva per HIV a basso rischio, il rischio di trasmissione verticale ed orizzontale del virus non deve essere sottovalutata.

Tabelle e figure

Tabella 1. Le principali caratteristiche della popolazione in studio al momento della prima visita.

	Casi	Controlli	P value
Numero di pazienti	43	241	
Gravidanze pretermine	23 (53.49%)	115 (47.72%)	0.44
Grado di istruzione			
<8 anni	5 (11.63%)	27 (11.2%)	
8-13 anni	34 (79.07%)	190 (78.84%)	
>13 anni	4 (9.3%)	24 (9.96%)	0.99
Fumatrici	28 (65.12%)	169 (70.12%)	0.59
Fattori di rischio			
Tossicodipendenza	11 (25.58%)	85 (35.27%)	
Trasmissione eterosessuale	32 (74.42%)	154 (63.9%)	0.42
Trasfusione di sangue		2 (0.83%)	
Partner HIV+	22 (51.16%)	107 (44.4%)	0.51
Terapia antiretrovirale	35 (81.4%)	183 (75.93%)	0.6
Pap Test			
Negativo	33 (76.74%)	143 (59.34%)	
L-SIL	10 (23.26%)	85 (35.27%)	
H-SIL		13 (5.39%)	0.6
Infezioni vaginali			
No	14 (32.56%)	123 (51.04%)	
Candida	9 (20.93%)	43 (17.84%)	
Trichomonas	2 (4.65%)	10 (4.15%)	
Vaginosi batteriche	18 (41.86%)	65 (26.97%)	0.14
Viremia			
Non rilevabile	23 (53.5%)	160 (72.4%)	
Rilevabile	20 (46.5%)	81 (33.6%)	0.13
Conta di linfociti CD4+			
<350	17 (39.53%)	88 (36.51%)	
350-599	17 (39.53%)	86 (35.68%)	
>600	9 (20.9%)	67 (27.8%)	0.64

Tabella 2. Le percentuali di shedding cervicovaginale di HIV nelle pazienti gravide al primo trimestre e nelle pazienti di controllo non gravide.

	Casi	Controlli	OR (95% CI)	P value
HIV-1 DNA				
Non rilevabile	21 (48.84%)	162 (67.22%)	Ref	
1-50 copie/mL	15 (34.88%)	51 (21.16%)	2.22 (1.0-4.89)	0.05
>50 copie/mL	7 (16.28%)	28 (11.62%)	1.5 (0.55-4.07)	0.43
Complessivo	22 (51.16%)	79 (32.78%)	1.94 (1.01-3.78)	0.05
Trascritti HIV-1 RNA				
Non rilevabile	30 (69.77%)	178 (73.86%)	Ref	
1-50 copie/mL	3 (6.98%)	39 (16.18%)	0.43 (0.12-1.55)	0.2
>50 copie/mL	10 (23.26%)	24 (9.96%)	2.37 (0.94-6.0)	0.07
Complessivo	13 (30.23%)	63 (26.14%)	1.15 (0.54-2.45)	0.72
HIV-1 RNA libero				
Non rilevabile	17 (39.53%)	169 (70.12%)	Ref	
1-199 copie/mL	7 (16.28%)	25 (10.37%)	3.36 (1.17-9.66)	0.02
>200 copie/mL	19 (44.19%)	47 (19.5%)	4.43 (2-9.87) 4.07	<0.001
Complessivo	26 (60.47%)	72 (29.88%)	(1.97-8.41)	<0.0001

Tabella 3. Le percentuali di isolamento degli acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali delle pazienti gravide nei tre trimestri studiati.

	I trimestre	II trimestre	III trimestre	P value
DNA				
Non rilevabile	21 (48.84%)	20 (51.28%)	17 (44.74%)	
1-50 copie/mL	15 (34.88%)	13 (33.33%)	14 (36.84%)	
>50 copie/mL	7 (16.28%)	6 (15.38%)	7 (18.42%)	
Complessivo	22 (51.16%)	19 (48.72%)	21 (55.26%)	0.98
Media (range)	194 (0-2000)	203 (0-2000)	212 (0-2000)	0.63
Trascritti RNA				
Non rilevabile	30 (69.77%)	29 (74.36%)	27 (71.05%)	
1-50 copie/mL	3 (6.98%)	2 (5.13%)	4 (10.53%)	
>50 copie/mL	10 (23.26%)	8 (20.51%)	7 (18.42%)	
Complessivo	13 (30.23%)	10 (25.64%)	11 (28.95%)	0.9
Media (range)	136 (0-2500)	237 (0-3500)	134 (0-2500)	0.71
RNA libero				
Non rilevabile	17 (39.53%)	18 (46.15%)	13 (34.21%)	
1-200 copie/mL	7 (16.28%)	4 (10.26%)	7 (18.42%)	
>200 copie/mL	19 (44.19%)	17 (43.49%)	18 (47.37%)	
Complessivo	26 (60.47%)	21 (53.85%)	25 (66.79%)	0.79
Media (range)	496 (0-7000)	621 (0-1500)	515 (0-1200)	0.83

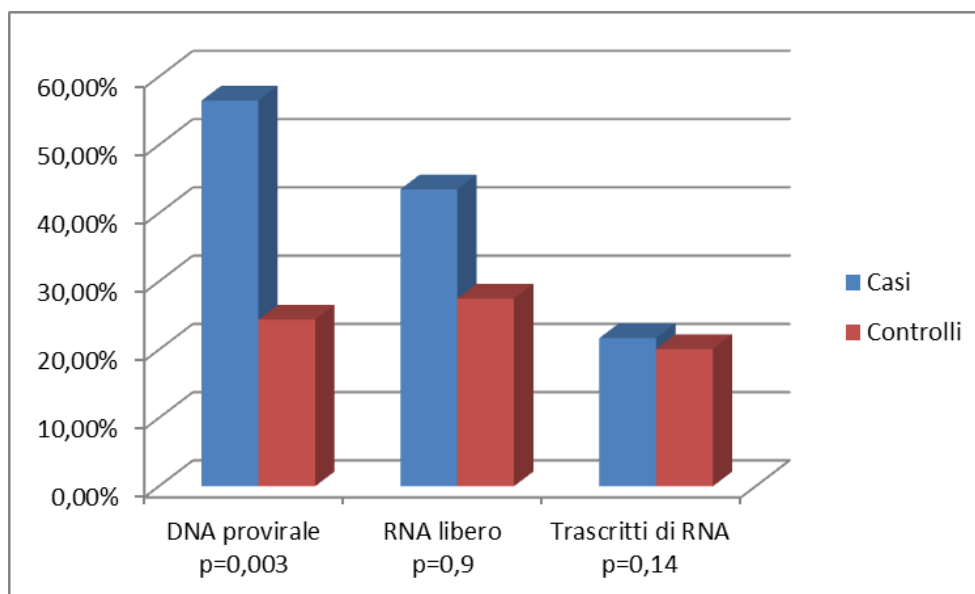


Figura 1. Le percentuali di isolamento degli acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali di donne con viremia plasmatica non rilevabile.

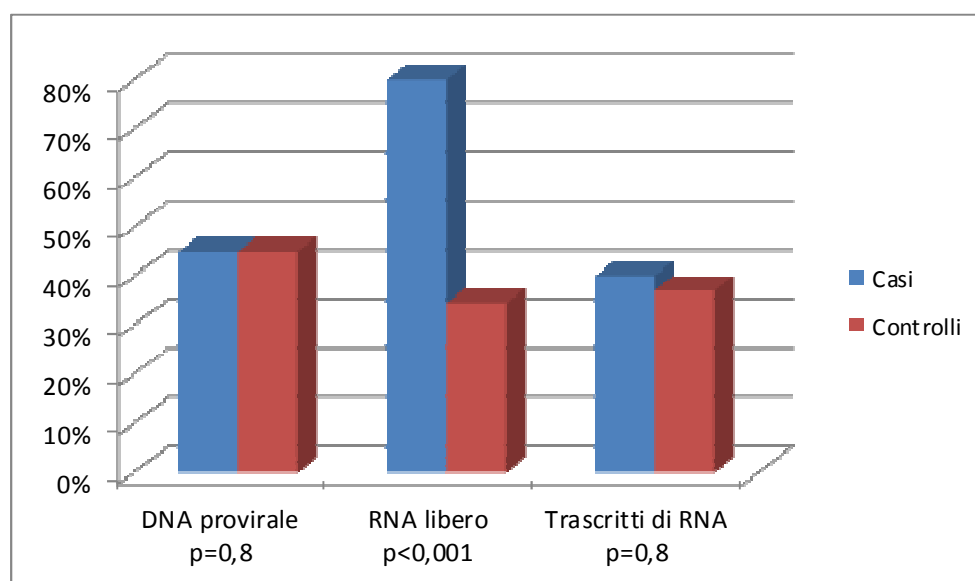


Figura 2. Le percentuali di isolamento degli acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali di donne con viremia plasmatica rilevabile.

Bibliografia

1. RCOG. Preventing mother-to-child transmission of HIV: successes and challenges. *International Journal of Obstet and Gynecol* 2005;112:1196-1203.
2. Newell ML. Mechanism and timing of mother-to-child transmission of HIV 1. *AIDS* 1998;12:831-837.
3. Gaillard P. Exposure to HIV-1 during delivery and mother-to-child transmission. *AIDS* 2000;14:2341-2348.
4. International Perinatal HIV Group. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1: a meta-analysis of 15 prospective cohort studies. *N Engl J Med* 1999;340:977-987.
5. European mode of delivery Collaboration. Elective caesarean section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV transmission: a randomized clinical trial. *Lancet* 1999;353:1035-1039.

6. Jamieson JD, Read JS, Kourtis A. Cesarean delivery for HIV infected women: recommendations and controversies. *AJOG* 2007;1:S96-S100.
7. RCOG. Management of HIV in pregnancy. *Green top Guideline* 2010;39:1-28.
8. Warszawski J, Tubiana R, Le Chenadec J. Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS French Perinatal cohort. *AIDS* 2008;22:289-299.
9. Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS et al. Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in United Kingdom and Ireland, 2000-2006. *AIDS* 2008;22:973-981.
10. Floridia M, Ravizza M. Italian Group on surveillance on antiretroviral treatment in pregnancy. Diagnosis of HIV infection in pregnancy: data from a national cohort of pregnant women with HIV in Italy. *Epidemiol Infect* 2006;134:1120-1127.
11. De Biaggi M, Spinillo A, Zara F et al. Quantitative assessment of cell-associated and cell-free virus in cervico-vaginal samples of HIV-1- infected women. *Clin microbiol Infect* 1999;5:605-611.
12. Ehrlich GD. PCR-based methods for the detection of the human reoviridae and Hepnadnaviridae. In: PCR-based diagnostics in infectious disease. *Blacwell Scientific Publications*, USA, 1994.
13. Menzo S, Bagnarelli P, Giacca M et al. Absolute quantitation of viremia in human immunodeficiency virus infection by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:1752-1757.
14. Kovacs A, Wasserman S, Burns D et al. Determinants of HIV-1 shedding in the genital tract of women. *Lancet* 2001;358:1593-1601.
15. De Biaggi M, Zara F, Spinillo A et al. Viral excretion in cervico secretions of HIV-1 infected women receiving antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 2001;20:91-96.
16. Hart CE, Lennox JL, Pratt-Palmore M et al. Correlation of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in blood and the female genital tract. *J Infect Dis* 1999;179:871-882.
17. Cu-Uvin S, De Long AK, Venkatesh KK et al. Genital tract HIV-1 RNA shedding among women with below detectable plasma viral load. *AIDS* 2010;24:2489-2497.
18. Spinillo A, De Biaggi M, Zara F et al. Human Immunodeficiency virus type 1- related nucleic acids and papillomavirus DNA in cervico-vaginal secretions of immunodeficiency virus-infected women. *Obstet Gynec* 2001;97:999-1004.
19. De Pasquale MP, Leigh Brown AJ, Uvin SC et al. Differences in HIV-1 pol sequences from female genital tract and blood during antiretroviral therapy. *JAIDS* 2003;34:37-44.
20. Philpott S, Burger H, Tsoukas C et al. Human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA sequences in the female genital tract and blood: compartmentalization and intrapatent recombination. *J Virol* 2005;79:353-363.
21. Chaudhary S, Noel RJ, Rodríguez N et al. Correlation between CD4 T cell counts and virus compartmentalization in genital and systemic compartments of HIV-infected females. *Virol* 2011; in press.
22. Chia C Wang, ScottMc Clelland R, Overbaugh J et al. The effect of hormonal contraception on genital tract shedding of the HIV-1. *AIDS* 2004;18:205-209.
23. John GC, Nduati RW, Mbori-Ngacha D et al. Genital shedding of HIV-1 DNA during pregnancy: association with immunodepression, abnormal cervical or vaginal discharge and severe vitamin A deficiency. *J Infect Disease* 1997;175:57-62.
24. Zdenek Hel. Sex steroid hormones, hormonal contraception and the immunobiology of HIV infection. *Endocrine Rev* 2010;31:79-97.
25. Benki S, Mostaf S, Richardson B et al. Cyclic shedding of HIV -1 RNA in cervical secretions during the menstrual cycle. *J Infect Dis* 2004;189:2192-2201.
26. Kolesnitchenko V, Stuart RS. Regulatory elements in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat LTR (HIV-1) responsive to steroid hormone stimulation. *AIDS Res Human Retrovir* 1992;8:1977-1978.
27. Grossman CJ. Regulation of the Immune System by sex steroids. *Endocrine Rev* 1984;5:435-455.
28. Coleman JS, Hitti J, Bukusi EA et al. Infectious correlates of HIV- 1 shedding in the female upper and lower genital tracts. *AIDS* 2007;21:755-759.
29. Spinillo A, Debiaggi M, Zara F et al. Factors associated with nucleic acid related to human immunodeficiency virus type 1 in cervico-vaginal secretions. *BJOG* 2001;108:634-641.
30. Cu-Uvin S, Hogan JW, Caliendo AM et al. Association between bacterial vaginosis and expression of human immunodeficiency virus type 1 RNA in the female genital tract. *Clin Infect Dis* 2001;33:894-896.
31. Johnson BT, Scott-Sheldon LA. Intervention to reduce sexual risk for Human Immunodeficiency virus among adolescents. A meta-analysis of trials, 1985-2008. *Arch Pediatric Adolesc Med* 2011;1:77-84.
32. Weller SC, Davis-Beatty K. Condom effectiveness in reducing heterosexual HIV transmission. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;1:CD003255.
33. Mostad S, Overbaugh J, De Vange D et al. Hormonal contraception, vitamin A deficiency, and other risk factors for shedding of HIV-1 infected cells from the cervix and vagina. *Lancet* 1997;350:922-927.
34. Baeten JM, Lavreys L, Overbaugh J. The influence of hormonal contraceptive use on HIV-1 transmission and disease progression. *Clin Infect Dis* 2007;45:360-369.
35. Wang CC, Reilly M, Kreiss JK. Risk of HIV infection in oral contraceptive users: a meta-analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;21:51-58.

36. Coombs RW, Speck CE, Hughes JP et al. Association between culturable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in semen and HIV rna levels in semen and in blood: evidence for compartmentalization of HIV-1 between semen and blood. *J Infect Dis* 1998;177:320-330.
37. Graham SM, Holte SE, Pesuv NM et al. Initiation of antiretroviral therapy leads to a rapid decline in cervical and vaginal HIV 1 shedding. *AIDS* 2007;21:501-507.
38. Tubiana R, Le Chenadec J, Rousioux C et al. Factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 despite a maternal viral load < 500 copies/mL at delivery: a case-control study nested in the French perinatal cohort (EPF-ANRS CO1). *Clin Infect Dis* 2010;50:585-596.
39. European Collaborative Study. Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2005;40:458-465.
40. Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW et al. Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. *N Engl J Med* 1996;335:1621-1629.
41. American College of Obstetricians and Gynecologist. Scheduled cesarean delivery and the prevention of vertical transmission of HIV infection: ACOG committee opinion no. 219: Committee on Obstetric Practice. *Int J Gynecol Obstet* 1999;66:305-306.
42. Chachoowang R, Shaffer N, Siriwasin W et al. Short-course of antenatal zidovudine reduces both cervico-vaginal human immunodeficiency virus type 1 RNA levels and risk of perinatal transmission. *J Infect Dis* 2000;181:99-106.