



Contracezione orale a basso dosaggio e *shedding* cervicovaginale del virus dell'immunodeficienza umana

Isabel Giacomina Calvino, Melissa Carrara, Anna Daniela Iacobone,
Marianna Roccio, Barbara Gardella, Arsenio Spinillo

*Clinica Ostetrico-Ginecologica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS
Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

Il ruolo dei contraccettivi orali a basso dosaggio nello shedding cervicovaginale di HIV tra le donne sieropositive è controverso

Obiettivo: abbiamo valutato l'effetto dei contraccettivi a basso dosaggio nello shedding cervicovaginale di HIV in una coorte di 285 donne sieropositive seguite per una media di circa 20 mesi. Sono stati impiegati la polimerasi competitiva (cPCR) e la trascrittasi inversa PCR (cRT-PCR) per quantificare l'HIV-RNA nelle cellule, l'HIV-RNA libero ed il DNA provirale nelle cellule cervicovaginali e l'HIV-RNA plasmatico.

Risultati: in una analisi logistica multivariabile, la carica virale plasmatica >100 copie/mL (OR=1.81, 95% CI=1.3-2.53) e le vaginosi batteriche (OR=1.49, 95% CI=1.1-2.02) sono associate ad un incrementato rischio di shedding di HIV-1 DNA, mentre il contemporaneo impiego di contraccettivi orali è associato ad un rischio ridotto (OR=0.55, 95% CI=0.33-0.92). L'uso di contraccettivi orali è associato inoltre ad un diminuito rischio di shedding di HIV-1 RNA cellulo-associato ma non di quello libero.

Conclusioni: nelle donne sieropositive con bassi livelli di viremia, l'impiego di contraccettivi orali a basso dosaggio sono associate ad una modesta ma significativa riduzione dello *shedding* genitale di HIV-1 DNA e di HIV-1 RNA.

The role of low-dose oral contraceptives on HIV cervicovaginal shedding among HIV-positive women is controversial

Objective: we evaluated the effect of low-dose oral contraceptives on HIV cervicovaginal shedding in a cohort of 285 HIV-seropositive women followed for a median of 20 months. A sensitive, competitive polymerase chain reaction (cPCR) and a reverse transcription PCR (cRT-PCR) were applied for the quantification of HIV-associated and cell-free RNA and proviral DNA in cervicovaginal cells, as well as HIV-RNA in plasma.

Results: in multivariable logistic analysis, plasma viral load >100 copies/mL (OR=1.81, 95% CI=1.3-2.53) and bacterial vaginosis (OR=1.49, 95% CI=1.1-2.02) were associated with an increased risk of HIV-1 DNA shedding, whereas current use of oral contraceptive was associated with a reduced risk (OR=0.55, 95% CI=0.33-0.92). Oral contraceptives were also associated with a reduction of risk (OR=0.38, 95% CI=0.21-0.69) of cell-associated but not cell-free HIV-1 RNA.

Conclusions: in HIV-positive women with low levels of HIV viremia, low-dose oral contraceptives were associated with a modest but significant reduction of HIV-1 DNA and cell-associated HIV-1 RNA genital shedding.

Introduzione

Secondo l'ultimo sondaggio condotto dall'OMS, il numero di persone nel mondo affette dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV) mondiale continua a crescere, raggiungendo un valore pari a circa 33.4 milioni [1]. Il numero totale di persone affette dal virus nel 2009 era più alto del 20% rispetto al 2000 e la prevalenza era aumentata di circa tre volte rispetto al 1990.

La pandemia da HIV sta incrementando in particolar modo nella popolazione femminile. In Europa, nel 2009 il 31% dei 30,000 nuovi casi di infezione da HIV era rappresentato da donne, la maggior parte delle quali era in età fertile (tra i 20 ed i 25 anni) [1].

L'eterosessualità e i rapporti sessuali vaginali non protetti sono le modalità più comuni di trasmissione dell'HIV, mentre la trasmissione madre-figlio rappresenta quella più frequente nei bambini; in entrambi i casi l'esposizione al virus avviene attraverso le secrezioni genitali [2-3].

Scopo del lavoro

I fattori che influenzano lo shedding dell'HIV o dei provirus cellulo-associati a livello del tratto genitale nelle donne sono probabilmente importanti determinanti di infettività e quindi di rischio di trasmissione durante il contatto sessuale o il parto. Sebbene la concentrazione plasmatica dell'HIV-1 RNA è probabilmente il fattore più importante per predire lo shedding genitale dell'HIV [4], anche la conta delle cellule CD4, la terapia antiretrovirale, le infezioni del tratto genitale ed i contraccettivi ormonali giocano un ruolo cruciale nell'infettività vaginale [2, 5-7].

Per quanto riguarda l'infettività dell'HIV, l'HIV-1 DNA provirale e l'HIV-1 RNA cellulo-associati sono stati considerati parametri di replicazione locale di HIV migliori dell'HIV-1 RNA libero [8]. Mentre il DNA del virus dell'immunodeficienza umana nelle secrezioni cervico-vaginali identifica le cellule infette ma non la presenza del virus, i trascritti virus-specifici unspliced di HIV-1 RNA sono parametri dell'attiva replicazione virale [9].

Questo studio è stato condotto per valutare le associazioni tra lo shedding cervicovaginale degli acidi nucleici HIV-correlati e variabili sociodemografiche in una coorte di donne sieropositive per HIV.

Materiali e metodi

Tra Gennaio 2000 e Dicembre 2009, durante il tradizionale screening per il cancro della cervice uterina condotto nel Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia del Policlinico San Matteo di Pavia, sono state arruolate 285 donne HIV positive per uno studio che mira ad identificare le possibili relazioni esistenti tra la presenza di acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali e le variabili demografiche, sessuali o cliniche delle pazienti. Il protocollo dello studio è stato esaminato ed è stato approvato dal Comitato Etico dell'IRCCS Policlinico S. Matteo. Tutte le donne hanno fornito il consenso informato per partecipare allo studio e sono state intervistate utilizzando un questionario standard riguardante dati demografici, clinici e sessuali, quali l'uso di contraccettivi o partner sessuali.

La valutazione iniziale e le visite di follow-up successive comprendevano un esame citologico e uno screening colposcopico per la neoplasia cervicale, l'identificazione di una infezione vaginale e la valutazione della presenza di acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali.

Le visite di follow-up sono state annualmente pianificate per le pazienti senza una storia di lesioni intraepiteliali squamose (SIL) e con Pap test ed esame colposcopico negativi; mentre ogni 3 o 6 mesi a seconda della severità della malattia nelle pazienti con una storia di SIL o trattate per una neoplasia intraepiteliale cervicale.

Per quanto riguarda la terapia antiretrovirale abbiamo considerato tre categorie: la prima comprende soggetti che non hanno ricevuto il trattamento antiretrovirale, la seconda le donne trattate con due inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI) e la terza soggetti trattati con almeno tre farmaci che comprendono ≥ 2 NRTI ed almeno un inibitore di proteasi.

Ogni visita ginecologica comprendeva un Pap test ed una raccolta di campioni vaginali mediante l'uso di bastoncini di ovatta sterili per diagnosticare la presenza di infezioni da candida, trichomonas o vaginosi batteriche. Per valutare l'infezione da candida, i campioni sono stati inoculati su terreni di agar destrosio di Sabouraud che contiene gentamicina. I campioni per l'isolamento di trichomonas sono stati inoculati in un terreno di cisteina-peptosio-fegato e maltosio, mentre la diagnosi di vaginosi è stata fatta secondo i criteri di Amsel et al. [10].

Ad ogni visita sono stati raccolti dai pazienti campioni di sangue periferico e sono stati determinati la conta dei linfociti CD4+ e i livelli plasmatici dell'HIV-1 RNA.

Sono state raccolte le secrezioni cervicovaginali dal fornice posteriore ruotando un tampone in Dacron e attraverso un lavaggio vaginale con 10 mL di RPMI-1640, seguita dall'aspirazione della sospensione dopo circa 1 minuto.

Sono stati impiegati i tamponi per rilevare l'HIV-1 RNA libero, mentre l'HIV-1 DNA provirale e i trascritti endocellulari di HIV-1 RNA sono stati rilevati dai campioni ottenuti con il lavaggio. Nel laboratorio i campioni sono stati centrifugati e successivamente esaminati con il microscopio per confermare l'assenza di globuli rossi e gli spermatozoi. La possibile contaminazione con sangue è stata controllata mediante uno screening per la determinazione di emoglobina (Multistix-10, cartine reagenti, la Corporazione di Bayer, Leverkusen, Germania). Una descrizione dettagliata dei metodi impiegati per rilevare e quantificare gli acidi nucleici HIV-correlati nel sangue e nelle secrezioni cervicovaginali è stata fornita altrove [11].

I tamponi sono stati incubati in un mezzo da 1 mL di RPMI 1640 e successivamente centrifugati. È stato utilizzato il supernatante HIV-1 RNA libero. L'HIV-1 DNA è stato estratto dal nucleo delle cellule cervicovaginali per minimizzare la contaminazione con DNA non integrato. L'RNA è stato estratto dai campioni cervicovaginali e dal plasma mediante il metodo tiocianato di guanidina [12]. I substrati ottenuti sono stati analizzati usando la reazione a catena polimerasica quantitativa (c-PCR) e la reazione a catena polimerasica della trascrittasi inversa (RT-PCR): (1) l'HIV-1 RNA dal plasma e dalle secrezioni cervicovaginali, (2) trascritti unspliced di HIV-1 RNA virus specifici dalle cellule cervicovaginali e (3) l'HIV-1 DNA provirali dai nuclei delle cellule cervicovaginali.

L'analisi qualitativa di sequenze specifiche di RNA e DNA è stata dapprima eseguita mediante PCR usando la coppia di primers SK 426/ 431 [13]. I campioni di RNA sono stati inversamente trascritti impiegando 100 U di trascrittasi inversa di virus leucemico murino Moloney (RT, Gibco Life Technologies, Paisley, Regno Unito), 20 pmol di primer SK 431, 0,2 mMol di deossinucleotidide trifosfato dNTP) e 20 U di RNAsin (Gibco Life Technologies). IL DNA è stato successivamente amplificato usando 50 pmol di coppie di primers SK 462 e SK 431, e 1,5 U di Taq-DNA polimerasi (Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, CA, USA).

La quantificazione dell'HIV-1 DNA e l'HIV-1 RNA è stata eseguita usando PCR e RT-PCR competitivi come descritti da Menzo et al. [13]. Per quanto riguarda i campioni cervicovaginali, i risultati quantitativi sono espressi come 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 millilitro di secrezioni cervicovaginali. È stato considerato il fattore di diluizione del campione cervicovaginale con una quantità nota di mezzo di trasporto (1 mL/campione) per il calcolo finale delle copie di HIV-1 RNA libero.

Ogni campione di tampone conteneva dai 200 ai 300 μ L di lavaggio cervicovaginale.

Nel nostro studio sperimentale, il limite più basso di rilevazione era pari a 2 copie di DNA o di RNA/10⁵ cellule, 20 copie di RNA/MI di secrezioni di cervicovaginali e 50 copie di RNA/mL di plasma. Complessivamente, le 285 pazienti arruolate nello studio sono state visitate per 1008 volte, compreso l'arruolamento. Abbiamo escluso dallo studio 28 campioni insufficienti per l'analisi.

Sono stati impiegati il Mann-Whitney U-test e il test del chi-quadrato per paragonare rispettivamente le variabili continue e categoriche. Sono state valutate le associazioni univariate e multivariate tra le variabili considerate e gli acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali impiegando equazioni logistiche generalizzate (GEE) [14]. Questa procedura fornisce stime di odds ratio attraverso metodi che valutano correlazioni tra molteplici variabili osservate nei soggetti [15]. Il metodo di GEE stima i parametri di regressione tenendo conto che le osservazioni sono indipendenti, valutare le correlazioni tra le osservazioni dagli stessi soggetti ed usa poi le stimate correlazioni per ottenere nuove valutazioni dei parametri di regressione. Questo processo è ripetuto finché il cambio tra due stime successive è molto piccolo. I calcoli sono stati eseguiti con STATA/SE 8.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

Risultati

Le caratteristiche sociodemografiche e cliniche delle pazienti arruolate sono riportate nella Tabella 1. L'età media è di 34.1 anni (6.5 SD). I contraccettivi orali a basso dosaggio comprendono quelli contenenti meno di 50 mcg di etileneestradiolo. All'arruolamento, il 22.5% (64/285) dei soggetti non ha ricevuto alcun trattamento antiretrovirale e il 17.2% (49/285) e il 60.3% (172/285) impiegavano rispettivamente due, tre o più farmaci antiretrovirali. La prevalenza della viremia di HIV-RNA è maggiore fra i soggetti che non assumono terapia antiretrovirale paragonata ai controlli trattati (36/64 come paragonato a 64/221, $p < 0.001$). Fra i soggetti non trattati, i tassi di rivelazione di HIV-1 DNA, dei trascritti di HIV-1 RNA e l'HIV-1 RNA libero nelle secrezioni cervicovaginali sono rispettivamente pari a 43.8% (28/64), 34.4% (22/64) e 39.1% (25/64) ($p=0.09$, 0.13 e 0.33), paragonati ai controlli trattati. Il periodo medio di follow-up è pari a circa 20 mesi (range 0-155); il numero globale di visite è 980 ed il numero medio di visite per paziente è 4 (range 1-20). I genomi dell'HIV-1 RNA nel plasma o nei campioni liberi cervicovaginali sono riscontrabili rispettivamente nel 34.4% (337/980) e nel 42.1% (413/980). Le secrezioni cervicovaginali contengono copie di HIV-1 DNA e trascritti di HIV-1 RNA rilevabili rispettivamente nel 36.9% (362/980) e nel 29.3% (287/980), delle visite. I tassi dei maggiori shedders (maggiore 1,000 copie) sono pari al 2% (20/980) per l'HIV-1 DNA e rispettivamente pari al 2.6% (25/980) e al 4.5% (44/980) per i trascritti di HIV-1 RNA e HIV-1 RNA libero.

Tra i pazienti con livelli misurabili di HIV nel plasma e nelle secrezioni cervicovaginali, il numero medio dei genomi di HIV-1 RNA è pari a 1240 copie/ml (range 50-700,000) nei campioni di plasma e 150 copie/ml (range 10-130,000) nei campioni cervicovaginali liberi. Il numero medio di copie di HIV-1 DNA e di trascritti di HIV-1 RNA per 10⁵ cellule è rispettivamente pari a 50 (range 5-2,000) e 60 (range 2-11,000). Quando l'HIV-1 RNA plasmatico non è rilevabile, il tasso d'identificazione dell'HIV-1 DNA nelle secrezioni cervicovaginali è 34.1% (219/643) e i tassi dei trascritti di HIV-1 RNA e del virus libero sono rispettivamente del 28.8% (185/643) e del 42.1% (271/643). La presenza di valori plasmatici di HIV-1 RNA misurabile è un fattore di rischio significativo della presenza di HIV-1 DNA cervicovaginale (143/362 paragonato a 194/618; OR=1.47, 95% CI=1.12-1.95, $p=0.005$ secondo il modello logistico GEE). Il carico virale di HIV-1 RNA plasmatico risulta correlato con le quantità di HIV-1 DNA nelle secrezioni cervicovaginali (Spearman $\rho=0.07$, $p=0.027$), ma non con lo shedding genitale dei trascritti di HIV-1 RNA (Spearman $\rho=0.035$, $p=0.25$) o con l'HIV-1 RNA libero (Spearman $\rho=-0.015$, $p=0.65$). Nel complesso l'HIV-1 RNA plasmatico è rilevabile nel 29.2%

(33/113) delle donne che assumono contraccettivi orali e nel 35.1% (304/867) dei controlli ($p=0.22$ dal test di chi-quadrato). Nel 17% delle visite (167/980), Le pazienti non assumono alcuna terapia antiretrovirale. La media delle copie di HIV-1 DNA su 10^5 cellule era del 29.7 (range 0-900) nelle pazienti che assumevano contraccettivi orali a basso dosaggio e 72.3 (range 0-2,000) nei controlli ($p=0.013$ da Mann-Whitney U test). Nelle analisi univariate, carichi plasmatici virali superiori a 100 copie/mL e le vaginosi batteriche sono associate a rischi incrementati di shedding di HIV-1 DNA, mentre l'impiego contemporaneo di contraccettivi orali è associato ad un rischio ridotto (Tabella 2). Nei modelli multivariati che comprendono simultaneamente le tre variabili sopra citate, la probabilità di shedding di HIV-1 DNA è incrementata da valori plasmatici di HIV-1 RNA superiore 100 copie/ml (OR=1.8, 95% CI=1.28-2.51, $p=0.001$) e dalle vaginosi batteriche (OR=1.46, 95% CI=1.08-1.96, $p=0.012$) ed è ridotto dal contemporaneo impiego di contraccettivi ormonali (OR=0.56, 95% CI=0.33-0.94, $p=0.028$). La tabella 3 mostra i risultati delle analisi univariate dei fattori che influenzano l'identificazione dei trascritti di HIV-1 RNA cervicovaginali impiegando i modelli logistici GEE. Il carico virale di HIV-1 plasmatico superiore alle 100 copie/ml e la candida vaginale sono associate ad un incrementato rischio significativo di shedding di HIV-1 RNA, mentre la contraccezione ormonale è associata a una riduzione del rischio. La media delle copie di HIV-1 RNA su 10^5 cellule è pari a 38.3 (range 0-1930) tra le donne che assumono contraccettivi orali e 147.3 (range 0-11.600) nei controlli ($p<0.0001$ secondo Mann-Whitney U test). Quando le variabili significativamente associate con lo shedding di HIV-1 RNA sono simultaneamente comprese come condizioni esplicative nei multivarabili modelli GEE, solo valori plasmatici di HIV-1 RNA superiori alle 100 copie/ml (OR=1.41, 95% CI=0.98-1.96, $p=0.04$) e la contraccezione ormonale (OR=0.039, 95% CI=0.21-0.71, $p=0.002$) risultano essere statisticamente significative. Le relazioni uni variate tra le variabili e il rilevamento di HIV-1 RNA libero nelle secrezioni cervicovaginali sono mostrate nella tabella 4. Nessuna delle variabili studiate è significativamente associata alla probabilità di rilevare HIV-1 RNA nelle secrezioni cervicovaginali.

Discussione

In questo studio, abbiamo esaminato la probabilità di rilevare acidi nucleici HIV-correlati nelle secrezioni cervicovaginali nelle pazienti con una storia di HIV. La principale differenza di questo studio su questo argomento paragonato ad altri studi riguarda la popolazione considerata. I soggetti di questo studio sono delle donne arruolate in un programma di follow-up a lungo termine, con livelli bassi di viremia di HIV e tassi bassi di malattie sessualmente trasmesse e complicanze HIV-correlate. I nostri risultati mostrano che le cellule infettate da HIV (HIV-1 DNA provirale) nelle secrezioni cervicovaginali possono essere riscontrate nel 36.9% dei pazienti affetti da HIV. In contrasto, i trascritti di HIV-1 RNA e l'HIV-1 RNA possono essere rilevati rispettivamente nel 29.3% e nel 42.1% dei soggetti. Questi dati concordano con quanto precedentemente riferito da Mostad et al. [2] e Cu Uvin e Caliendo [16] ma inferiori a quelli riportati da altri, anche se abbiamo impiegato test di rilevamento differenti per rilevare l'HIV a livello del tratto cervicovaginale [4, 17].

Poiché l'HIV-1 DNA provirale nelle secrezioni cervicovaginali identifica le cellule contagiate ma non la presenza di virus replicante, abbiamo deciso di quantificare simultaneamente l'HIV-1 DNA provirale e cellulo-associato e l'HIV-1 RNA libero. L'identificazione di trascritti di HIV-1 RNA cellulo-associato è un marker di attiva replicazione virale, mentre l'HIV-1 RNA libero riflette principalmente il passaggio passivo virale dal plasma ai fluidi genitali [8-9]. La determinazione simultanea di queste tre differenti forme rappresenta una valutazione più completa dello shedding dell'HIV a livello genitale rispetto all'uso più semplice dell'RNA libero impiegato negli altri studi e rappresenta il punto di

forza del nostro studio. Inoltre, la contaminazione con sangue associata, per esempio, ad un'ulcera genitale è un elemento che potrebbe influenzare il rilevamento di HIV nelle secrezioni cervicovaginali. Per ridurre tale rischio, abbiamo controllato ogni campione utilizzando un test di screening di routine che determina la presenza di emoglobina. Dai precedenti studi, il rapporto tra lo shedding genitale e la viremia di HIV è controverso, mentre alcuni autori non hanno dimostrato alcuna associazione statisticamente significativa [17], altri più recentemente hanno riferito una correlazione significativa tra l'HIV-1 RNA plasmatico e l'HIV-1 RNA libero nelle secrezioni cervicovaginali [4, 9, 16].

Il nostro studio mostra che la presenza di livelli misurabili di HIV-1 RNA plasmatici (>100 copie/mL) è un fattore di rischio significativo per la presenza di HIV-1 DNA cervicovaginale e HIV-1 RNA cellulo-associato ma che non è correlato con la quantità di HIV-1 RNA cell-free cervicovaginale. L'HIV-1 RNA plasmatico è il fattore di rischio che meglio correla con il rilevamento di acidi nucleici nelle secrezioni cervicovaginali. Tuttavia, tra il 30% e il 40% di donne non-viremiche ha avuto acidi nucleici HIV correlati nei campioni cervicovaginali non rilevabili. Nonostante le differenti sensibilità dei metodi impiegati per rilevare degli acidi nucleici virali nel plasma e nelle secrezioni cervicovaginali, non può essere escluso un possibile meccanismo biologico responsabile di tale risultato. Per esempio, analogamente alla compartimentalizzazione del virus che si verifica nel tratto genitale maschile, è possibile che il processo che regola la replicazione dell'HIV nelle secrezioni cervicovaginali sia diverso da quello plasmatico [5, 7-8]. Altri studi suggeriscono che la presenza di HIV nel tratto genitale non è semplicemente indice di contaminazione con sangue e che la riproduzione dell'HIV si può verificare nel tratto genitale indipendentemente dalla presenza dell'HIV stesso nel sangue [4, 9, 17]. Queste informazioni potrebbero essere utili nel futuro per informare il paziente circa il rischio di trasmissione sessuale ad un partner o ad un neonato. Oltre la concentrazione plasmatica di HIV-1 RNA, i fattori che influenzano lo shedding di HIV nel tratto genitale femminile sono la conta dei linfociti CD4+, la terapia antiretrovirale, le malattie associate ad ulcere genitali o altre malattie sessualmente trasmesse, il fumo e l'uso di contraccettivi ormonali [2, 4, 18-19]. Oltre a queste variabili, i fattori locali e sistemici influenzano probabilmente la cinetica della replicazione virale di HIV nelle secrezioni cervicovaginali; per esempio, l'infezione da candida e le vaginosi batteriche potrebbe avere un ruolo nel facilitare la replicazione e lo shedding genitale di HIV aumentando l'infiammazione cervicovaginale e modulando il pH delle secrezioni vaginali [7, 20]. I precedenti studi riguardanti il rapporto tra infezioni cervicovaginali e la carica di HIV a livello delle secrezioni genitali hanno suggerito che la presenza di una risposta infiammatoria locale vaginale potrebbe essere un fattore chiave dello shedding di HIV genitale [18, 21-22]. In particolare, Wright et al. [23] ha notato che lo shedding di HIV nelle secrezioni genitali potrebbe essere aumentato di circa 10,000 volte nelle donne HIV-infette con l'infiammazione cervicale. Le nostre analisi univariate hanno dimostrato che nelle secrezioni cervicovaginali i trascritti di HIV-1 RNA e di HIV-1 DNA erano più elevati rispettivamente nelle pazienti con infezione da candida e con vaginosi batterica, mentre non vi era alcuna differenza nell'identificazione di HIV-1 RNA libero tra i soggetti con le infezioni vaginali. Dopo la correzione delle analisi multivariate per la presenza di HIV nel sangue, le vaginosi batteriche sono tuttavia ancora associate ad una aumentata probabilità di rilevare l'HIV-1 DNA nel tratto genitale (OR=1.47), ma non possiamo individuare un incremento statisticamente significativo della concentrazione di trascritti di HIV-1 RNA tra i soggetti con infezione vaginale da candida. Questo suggerisce che l'infezione vaginale e un'alterata flora vaginale sono associate ad un incrementato shedding di HIV a livello genitale, indicando probabilmente l'incrementata replicazione virale ed un potenziale incremento del rischio di trasmissione di HIV ai partner sessuali. Diversi autori hanno focalizzato l'attenzione sull'effetto della contraccezione ormonale sulla vulnerabilità all'HIV-1 e sulla progressione della malattia HIV correlata [2, 4, 24-26]. Gli studi su questo argomento sono discordanti, dall'effetto protettivo della contraccezione orale sulla probabilità di acquisire l'infezione da HIV, a nessuno effetto e ad un incrementato rischio attraverso l'uso di acetato di

medrossiprogestosterone depot iniettabile (DMPA) [2, 4, 24-25]. I dati degli studi clinici e sperimentali suggeriscono che la contraccezione con progesterone, e in particolare con il DMPA iniettabile, aumentano il rischio di acquisizione di HIV-1 ma probabilmente anche il tasso di progressione della malattia HIV correlata [26]. Contrariamente ai progestinici, gli estrogeni esercitano un potente effetto protettivo, riducendo il tasso di acquisizione virale negli animali sperimentati [27]. Pochi studi hanno valutato gli effetti dei contraccettivi orali a basso dosaggio sullo shedding dell'HIV e sulla progressione della malattia da HIV. Wang et al. [28] hanno notato che l'uso da parte delle donne HIV-positivo sia dei contraccettivi orali che delle iniezioni di DMPA è stato associato ad un incremento modesto di shedding di HIV-1 DNA, ma non di HIV-1 RNA. Cejtin et al. [29] hanno dimostrato che non ci sono associazioni tra l'uso di steroidi sessuali e i livelli plasmatici di HIV-1 RNA e inoltre che la contraccezione ormonale (contraccezione orale, DMPA iniettabile ed il levonorgestrel sottocutaneo) non sembra modificare la carica virale di HIV. Precedenti studi [2, 4-6] sull'associazione tra contraccezione orale e iniettabile e lo shedding a livello del tratto genitale femminile di HIV sono stati condotti principalmente sui soggetti con elevati livelli plasmatici di HIV-1 RNA, con elevati tassi di malattie sessualmente trasmesse e tassi bassi di terapia antiretrovirale. Per concludere, uno studio che valuta l'effetto della contraccezione orale sulla trasmissione dell'HIV tra donne-uomini in coppie discordanti non ha trovato alcuna associazione [30].

Nel nostro studio, dopo la correzione di potenziali effetti confondenti della vaginosi batterica e dell'HIV plasmatico, abbiamo trovato che sia i trascritti di HIV-1 RNA sia l'HIV-1 DNA nelle secrezioni cervicovaginali presentano valori più bassi tra i pazienti che fanno uso di contraccettivi orali a basso dosaggio. La rilevazione di HIV-1 RNA nel plasma e di HIV-1 RNA libero nelle secrezioni genitali non è influenzato dai contraccettivi orali ormonali combinati. Questi risultati suggeriscono che l'assunzione di contraccettivi orali a basso dosaggio da parte di donne con livelli bassi di viremia plasmatica in terapia antiretrovirale non incrementa il rischio di shedding di HIV a livello genitale. I metodi contraccettivi sicuri ed efficaci svolgono un ruolo cruciale nelle donne infette e a rischio di infezione da HIV. Se un determinato metodo contraccettivo è dimostrato non essere in grado di influenzare lo shedding genitale di particelle virali, le donne HIV positive che ne fanno uso possono essere rassicurate. In attesa di ulteriori studi sull'argomento, la protezione combinata (impiego contemporaneo di preservativi per impedire il contagio con malattie sessualmente trasmesse e di pillole ormonali per minimizzare il rischio di gravidanze non desiderate) è sempre consigliabile.

Tabelle e figure

Tabella 1. Caratteristiche socio demografiche e cliniche di 285 pazienti sieropositivi all'arruolamento.

	Gruppi	N (%)
Età (anni)	<i>≤21</i>	5 (1.8)
	<i>22-30</i>	75 (26.3)
	<i>31-40</i>	169 (59.3)
	<i>>40</i>	36 (12.6)
Numero di gravidanze	<i>0</i>	146 (51.2)
	<i>1</i>	84 (29.5)
	<i>>1</i>	55 (19.3)
Educazione	<i>Scuola elementare</i>	16 (5.6)
	<i>Scuola media</i>	150 (52.6)
	<i>Liceo</i>	84 (29.5)
	<i>Università</i>	35 (12.3)
Infezione da HIV, eziologia	<i>Abuso di droghe (e.v.)</i>	106 (37.2)
	<i>Trasfusione</i>	5 (1.8)
	<i>Eterosessuale</i>	172 (60.3)
	<i>Incerta</i>	2 (0.7)
Numero di partner sessuali all'arruolamento	<i>0-1</i>	34 (11.9)
	<i>2-4</i>	192 (67.4)
	<i>>4</i>	59 (20.7)
Tabagismo	<i>No</i>	113 (39.7)
	<i>Sì</i>	172 (60.3)
Contracezione	<i>Nessuna o naturale</i>	98 (34.4)
	<i>Pillola a basso dosaggio</i>	49 (17.2)
	<i>Condom</i>	130 (45.6)
	<i>IUD</i>	8 (2.8)
Terapia ARV	<i>No</i>	64 (22.4)
	<i>2 farmaci</i>	49 (17.2)
	<i>≥3 farmaci (HAART)</i>	172 (60.3)
HIV viremia	<i>Sì</i>	100 (35.1)
	<i>No</i>	185 (64.9)
HIV-1 DNA CVS	<i>Sì</i>	99 (34.7)
	<i>No</i>	186 (65.3)
Trascritti HIV-1 RNA CVS	<i>Sì</i>	76 (26.7)
	<i>No</i>	209 (73.3)
HIV-1 cell-free CVS	<i>Sì</i>	98 (34.4)
	<i>No</i>	187 (65.6)

Tabella 2. Associazione tra fattori demografici e clinici e DNA HIV-1 provirale nelle secrezioni cervico-vaginali.

	Gruppi	No (618)	Sì (362)	OR (95% CI)
Viral load	<i>0 copie</i>	424	219	Riferimento
	<i>≤100 copie</i>	96	56	1.15 (0.79–1.67)
	<i>≥100 copie</i>	98	87	1.81 (1.3–2.53)
Conta delle cellule CD4	<i>≤350 cell/mm³</i>	185	123	Riferimento
	<i>351–599 cell/mm³</i>	244	133	0.77 (0.56–1.07)
	<i>≥600 cell/mm³</i>	189	106	0.71 (0.50–1.02)
Trattamento ARV		519	294	0.78 (0.54–1.13)
Partner HIV positivo		186	134	1.33 (0.95–1.86)
Pap test	<i>Negativo</i>	414	230	Riferimento
	<i>L-SIL</i>	180	124	1.25 (0.93–1.69)
	<i>H-SIL</i>	24	8	0.69 (0.31–1.56)
Tabagismo		360	223	1.14 (0.82–1.57)
Infezioni genitali	<i>Nessuna</i>	381	191	Riferimento
	<i>Candida</i>	71	48	1.28 (0.85–1.93)
	<i>Trichomonas</i>	18	9	1.0 (0.43–2.36)
	<i>Vaginosi batterica</i>	148	114	1.49 (1.1–2.02)
Contracezione	<i>Nessuna o naturale</i>	227	131	Riferimento
	<i>Contracezione orale ormonale</i>	82	31	0.55 (0.33–0.92)
	<i>Condom</i>	298	194	1.18 (0.86–1.64)
	<i>IUD</i>	11	6	0.88 (0.29–2.10)

Tabella 3. Associazione tra fattori demografici e clinici e RNA HIV-1 cellula-associato nelle secrezioni cervico-vaginali.

	Gruppi	No (618)	Sì (362)	OR (95% CI)
Viral load	<i>0 copie</i>	458	185	Riferimento
	<i>≤100 copie</i>	116	36	0.77 (0.51–1.17)
	<i>≥100 copie</i>	119	66	1.42 (1.0–2.02)
Conta delle cellule CD4	<i>≤350 cell/mm³</i>	209	99	Riferimento
	<i>351–599 cell/mm³</i>	274	103	0.76 (0.56–1.07)
	<i>≥600 cell/mm³</i>	210	85	0.79 (0.55–1.14)
Trattamento ARV		519	583	230
Partner HIV positivo		186	186	134
Pap test	<i>Negativo</i>	463	181	Riferimento
	<i>L-SIL</i>	206	98	1.19 (0.87–1.63)
	<i>H-SIL</i>	24	8	0.96 (0.43–2.17)
Tabagismo		360	421	162
Infezioni genitali	<i>Nessuna</i>	412	160	Riferimento
	<i>Candida</i>	75	44	1.57 (0.85–1.93)
	<i>Trichomonas</i>	24	3	0.18 (0.04–1.04)
	<i>Vaginosi batterica</i>	182	80	1.1 (0.79–1.52)
Contracezione	<i>Nessuna o naturale</i>	241	117	Riferimento
	<i>Contracezione orale ormonale</i>	96	17	0.38 (0.21–0.69)
	<i>Condom</i>	346	146	1.01 (0.74–1.41)
	<i>IUD</i>	10	7	1.37 (0.56–4.41)

Tabella 4. Associazione tra fattori demografici e clinici e RNA HIV-1 non cellula-associato nelle secrezioni cervico-vaginali.

	Gruppi	No (618)	Sì (362)	OR (95% CI)
Viral load	<i>0 copie</i>	372	271	Riferimento
	<i>≤100 copie</i>	93	59	0.82 (0.57–1.19)
	<i>≥100 copie</i>	102	83	1.13 (0.81–1.58)
Conta delle cellule CD4	<i>≤350 cell/mm³</i>	187	121	Riferimento
	<i>351–599 cell/mm³</i>	202	175	1.3 (0.96–1.82)
	<i>≥600 cell/mm³</i>	178	117	0.97 (0.69–1.38)
Trattamento ARV		519	468	345
Partner HIV positivo		186	179	141
Pap test	<i>Negativo</i>	359	285	Riferimento
	<i>L-SIL</i>	187	117	0.74 (0.57–1.04)
	<i>H-SIL</i>	21	11	0.7 (0.33–1.48)
Tabagismo		360	350	233
Infezioni genitali	<i>Nessuna</i>	323	249	Riferimento
	<i>Candida</i>	74	45	0.83 (0.55–1.24)
	<i>Trichomonas</i>	18	9	0.61 (0.26–1.44)
	<i>Vaginosi batterica</i>	152	110	0.91 (0.67–1.24)
Contracezione	<i>Nessuna o naturale</i>	213	145	Riferimento
	<i>Contracezione orale ormonale</i>	63	50	1.15 (0.74–1.79)
	<i>Condom</i>	282	210	1.04 (0.77–1.41)
	<i>IUD</i>	9	8	1.26 (0.45–3.57)

Bibliografia

1. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO). AIDS epidemic update: November 2009.
2. Mostad S, Overbaugh J, DeVange 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.
3. Prakash M, Kapembwa MS, Gotch F et al. Oral contraceptive use induces upregulation of the CCR5 chemokine receptor on CD4⁺ cells in the cervical epithelium of healthy women. *J Reprod Immunol* 2002;54:117-131.
4. Kovacs A, Wasserman SS, Burns D et al. Determinants of HIV-1 shedding in the genital tract of women. *Lancet* 2001;358:1593-1601.
5. Fiore JR, Suligoi B, Saracino A et al. Correlates of HIV-1 shedding in cervicovaginal secretions and effects of antiretroviral therapies. *AIDS* 2003;17(15):2169-2176.
6. 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.
7. Spinillo A, Debiaggi M, Zara F et al. Factors associated with nucleic acids related to human immunodeficiency virus type 1 in cervico-vaginal secretions. *BJOG* 2001;108:634-641.
8. Andreoletti L, Chomont N, Gresenguet G et al. Independent levels of cell-free and cell-associated human immunodeficiency virus-1 in genital tract secretions of clinically asymptomatic, treatment-naïve African women. *J Infect Dis* 2003;188:549-554.
9. Spinillo A, Debiaggi M, Zara F et al. Human immunodeficiency virus type 1-related nucleic acids and papillomavirus DNA in cervicovaginal secretions of immunodeficiency virus-infected women. *Obstet Gynecol* 2001;97:999-1004.

10. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA et al. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983;74:14-22.
11. Spinillo A, Zara F, De Santolo A et al. Quantitative assessment of cell-associated and cell-free virus in cervicovaginal 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 Retroviridae and Hepadnaviridae. In: PCR-based diagnostics in infectious disease. *Blackwell Scientific Publications*, Boston, Massachusetts, 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. Zeger SL, Liang KY, Albert PS. Models for longitudinal data: a generalized estimating equation approach. *Biometrics* 1988;44:1049-1060.
15. Lipsitz SR, Kim K, Zhao L. Analysis of repeated categorical data using generalized estimating equations. *Stat Med* 1994;13:1149-1163.
16. Cu Uvin S, Caliendo AM. Cervicovaginal human immunodeficiency virus secretion and plasma viral load in human immunodeficiency virus-seropositive women. *Obstet Gynecol* 1997;90:739-743.
17. Rasheed S. Infectivity and dynamics of HIV type 1 replication in the blood and reproductive tract of HIV type 1-infected women. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:S105-S117.
18. Heikinheimo O, Lähteenmäki P. Contraception and HIV infection in women. *Hum Reprod Update* 2009;15:165-176.
19. Coombs RW, Reichelderfer PS, Landay AL. Recent observations on HIV type-1 infection in the genital tract of men and women. *AIDS* 2003;17:455-480.
20. Spinillo A, Zara F, Gardella B et al. Cervical intraepithelial neoplasia and cervicovaginal shedding of human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol* 2006;107(2 Pt 1):314-320.
21. Spinillo A, Zara F, Gardella B et al. The effect of vaginal candidiasis on the shedding of human immunodeficiency virus in cervicovaginal secretions. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:774-779.
22. Cohen MS. Sexually transmitted diseases enhance HIV transmission: no longer a hypothesis. *Lancet* 1998;351:5-7.
23. Wright TC, Subbarao S, Ellerbrock TV et al. Human immunodeficiency virus 1 expression in the female genital tract in association with cervical inflammation and ulceration. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:279-285.
24. 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.
25. Wang CC, Reilly M, Kreiss JK. Risk of HIV infection in oral contraceptive pill users: a meta-analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;21:51-58.
26. Hel Z, Stringer E, Mestecky J. Sex steroid hormones, hormonal contraception, and the immunobiology of human immunodeficiency virus-1 infection. *End Rev* 2010;31:79-97.
27. Smith SM, Baskin GB, Marx PA. Estrogen protects against vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2000;182:708-715.
28. Wang CC, McClelland RS, Overbaugh J et al. The effect of hormonal contraception on genital tract shedding of HIV-1. *AIDS* 2004;18:205-209.
29. Cejtin HE, Jacobson L, Springer G et al. Effect of hormonal contraceptive use on plasma HIV-1-RNA levels among HIV-infected women. *AIDS* 2003;17:1702-1704.
30. European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV. Comparison of female to male and male to female transmission in 563 stable couples. *BMJ* 1992;304:809-813.