



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**Risposta immune umorale e cellulo-mediata
dopo vaccinazione contro SARS-CoV-2 in
soggetti con infezione da HIV**

Relatore: Chiar.mo
Prof. Andrea Costantini

Tesi di Laurea di:
Matteo Gasparroni

Correlatore: Chiar.ma
**Dott.ssa Elena Busilacchi
Marinelli**

A.A. 2021/2022

INDICE DEI CONTENUTI

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | 1 |
| 1.1 Immuno-patogenesi dell'infezione da HIV | 5 |
| 1.1.1 Alterazioni fenotipiche e funzionali T-/B-cellulari | 6 |
| 1.1.2 Terapia antiretrovirale combinata: razionale e ruolo nell'immunopatogenesi da HIV | 9 |
| 1.2 Infezione da SARS-CoV-2: patogenesi e coinvolgimento del sistema immunitario dell'ospite | 11 |
| 1.3 Impatto della coinfezione HIV/SARS-CoV-2 sulla risposta T-cellulare | 13 |
| 1.4 Vaccini anti-COVID-19 disponibili in Italia: tipologie, efficacia e immunogenicità | 16 |
| 2. OBIETTIVI DELLA TESI | 20 |
| 3. MATERIALI E METODI | 22 |
| 3.1 Campionamento, criteri di inclusione nello studio e classificazione dei partecipanti arruolati | 22 |
| 3.2 Fonte dei dati | 24 |
| 3.2.1 Casistica studiata | 24 |
| 3.2.2 Immuno-dosaggi | 25 |
| 3.3 Analisi Statistica | 26 |
| 3.3.1 Metodologia statistica in sintesi | 26 |
| 3.3.2 Struttura dell'analisi statistica: razionale e fasi | 27 |
| 3.3.3 Materiali e modalità di presentazione dei risultati | 31 |
| 4. RISULTATI | 32 |
| 4.1 Caratteristiche dei campioni di popolazione esaminati | 32 |
| 4.1.1 Aspetti sociodemografici della casistica | 32 |
| 4.1.2 Schemi di vaccinazione relativi ai partecipanti | 32 |
| 4.1.3 Età e tempo trascorso dall'ultima vaccinazione fino al momento della rilevazione | 33 |
| 4.1.4 Parametri di risposta al vaccino: concentrazioni di IFN- γ e di anticorpi anti-S | 35 |
| 4.1.5 Variabili specifiche del gruppo PLWH | 39 |
| 4.2 Risposta T-cellulare valutata in base alla secrezione di IFN-γ | 40 |
| 4.3 Risposta umorale basata sulle concentrazioni di anticorpi circolanti anti-S | 44 |
| 4.4 Andamento delle risposte T-cellulare e anticorpale rispetto al tempo trascorso dall'ultima dose di vaccino | 45 |
| 4.5 Interazione tra risposta cellulo-mediata e umorale al vaccino anti-SARS-CoV-2 | 57 |
| 4.6 Associazioni tra marcatori di risposta immune specifica al vaccino anti-COVID-19 e variabili caratteristiche del gruppo HIV-positivo | 60 |
| 5. DISCUSSIONE | 73 |
| 6. CONCLUSIONI | 85 |
| 7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA | 87 |

1. INTRODUZIONE

Lo scoppio della pandemia da SARS-CoV-2 ha reso necessario comprendere i fondamenti dell'interazione fra questo virus ed HIV.

Nell'affrontare la pandemia da COVID-19, particolare attenzione è stata rivolta sin da subito a quelle categorie di individui fragili, con comorbidità, neoplasie e/o con status immunitario compromesso a seguito di terapia immunosoppressive o malattie responsabili di immunodeficienza, come l'infezione da HIV: queste categorie potrebbero rappresentare dei potenziali candidati allo sviluppo di COVID-19 severo ed essere a maggior rischio di infezione e *outcomes* clinici peggiori rispetto ai pazienti sani, quali ospedalizzazione, necessità di cure intensive e, infine, morte.

In effetti i pazienti con diagnosi pregressa di HIV sembrano presentare, rispetto a soggetti senza diagnosi, un rischio incrementato di esito sfavorevole legato alla malattia da SARS-CoV-2 con maggior frequenza di manifestazioni cliniche gravi, che richiedono l'ospedalizzazione, e di morte ^{[1],[2],[3]}.

In particolare, è necessario tener conto di quel sottogruppo di individui con controllo inadeguato o subottimale dell'infezione e avanzata immunodeficienza (conta T CD4⁺ < 200 cellule/mm³) che potrebbero subire le conseguenze peggiori di una coinfezione HIV/SARS-CoV-2^[4].

Il virus dell'immunodeficienza umana (*human immunodeficiency virus*, HIV) causa uno stato di disfunzione immunitaria sistemica, coinvolgendo principalmente i linfociti T CD4⁺, che svolgono un ruolo cruciale nel coordinamento delle risposte sia innate che specifiche agli agenti patogeni.

L'alterazione principale indotta dal virus è rappresentata da una drastica caduta della conta delle cellule T CD4⁺ in fase acuta, che si manifesta precocemente con la comparsa di linfopenia periferica, segno distintivo dell'infezione da HIV ^[5], e prosegue con un costante declino in fase cronica.

La deplezione, la disfunzione T cellulare HIV-indotte e la persistenza del virus, insieme, contribuiscono ad uno stato di attivazione sistemica e disregolazione delle funzioni immunitarie, portando, infine, all'insorgenza di una condizione di immunodeficienza conclamata ^{[6],[7]}.

Il bisogno impellente di definire gli effetti dell'infezione da SARS-CoV-2 sul sistema immunitario, per mettere a punto strategie terapeutiche in grado di contrastare efficacemente

l'infezione, ha messo in evidenza che il virus innesca una risposta contraddistinta da una riduzione significativa nel numero di linfociti T CD4⁺ (helper e regolatori), CD8⁺, B, NK più marcata nei casi severi di malattia^{[8]-[16]}; perciò, in corso di infezione acuta da SARS-CoV-2 l'alterazione di entrambi i bracci effettori dell'immunità specifica, con deplezione marcata dei tre principali *subset* linfocitari, si associa a maggior severità di malattia, di cui il drastico decremento della conta T- e B-cellulare oppure l'aumento del rapporto CD4⁺/CD8⁺ rappresentano fattori predittivi di *outcome*^{[12]-[16],[18],[19]}.

SARS-CoV-2 induce una robusta risposta T, che si presenta più ampia e più forte nei pazienti con malattia severa rispetto ai guariti, probabilmente a causa di un'alta carica virale, un malfunzionamento dell'immunità cellulo-mediata, incapace di contenere il virus, o per una scarsa attivazione dell'immunità innata risultante da alterazioni cellulari virus-indotte. Al contrario, la severità di malattia potrebbe essere anche la conseguenza di un danno T-mediato^[17].

È ampiamente dimostrato in letteratura che è fondamentale l'intervento e l'interazione dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ non solo per il controllo della replicazione, la riduzione della diffusione virale ed il *killing* diretto del virus o delle cellule infettate^{[18],[19]}, ma anche per lo sviluppo di una memoria protettiva di verosimile lunga durata^[20]; inoltre, è stato osservato che un'attività coordinata cellulo-mediata (CD4⁺ e CD8⁺-cellulare) e umorale è in grado di contenere il danno legato all'infezione virale e limitare il rischio di manifestazioni gravi in misura maggiore rispetto ad una risposta parziale basata sull'intervento dominante di una singola popolazione linfocitaria^[21].

Queste evidenze supportano l'ipotesi che la compromissione della risposta cellulo-mediata virus-specifica possa contribuire alla comparsa di complicanze gravi legate a COVID-19: quando SARS-CoV-2 entra in contatto con il sistema immune dell'ospite, si stabiliscono molteplici interazioni virus-ospite che possono condurre ad una riduzione delle popolazioni linfocitarie, una perturbazione dei normali meccanismi di attivazione ed immuno-regolatori e ad alterazioni del profilo funzionale delle cellule T^{[13],[22]-[24]}, eventi che, complessivamente, predisporrebbero al fallimento della risposta antivirale.

Alla luce di queste osservazioni un ospite con uno stato di immunodeficienza HIV-indotta preesistente e un numero di cellule CD4⁺ funzionalmente e quantitativamente difettive in partenza potrebbe essere più vulnerabile ad un generale insuccesso della risposta SARS-CoV-2-specifica, con tutti i rischi sopra esposti: l'infezione sostenuta da SARS-CoV-2 non

solo colpirebbe un sistema immunitario già debilitato da HIV ma ne amplificherebbe il danno sulle popolazioni linfocitarie portando potenzialmente ad un collasso delle difese dell'ospite e ad un conseguente esito sfavorevole.

Tuttavia, si può anche ipotizzare che uno stato di immunodeficienza, indotta dalla persistenza di HIV, limiti l'eccessiva risposta del sistema immunitario a SARS-CoV-2, prevenendo la cascata di eventi alla base del danno tissutale immuno-mediato in corso di COVID-19 e, di conseguenza, il rischio di un decorso clinico più severo ^[17].

Attualmente, dopo molti sforzi orientati in primis alla caratterizzazione della risposta cellulo-mediata e umorale contro SARS-CoV-2 nei sani, si è giunti all'evidenza dell'esistenza di possibili meccanismi immunopatologici, condivisi dai due agenti virali nell'attacco al sistema immunitario dell'ospite, con implicazioni rilevanti sia a livello clinico che di prevenzione o protezione dalla COVID-19 severa.

Bloccare oppure ostacolare gli eventi immuno-patologici che conducono alla perdita degli elementi cellulari effettori dell'immunità e/o al deterioramento funzionale, alla ridotta risposta alla stimolazione da parte di antigeni microbici, all'iperattivazione, all'esaurimento e apoptosi delle cellule del sistema immunitario e, infine, all'immunosenescenza, potrebbe rappresentare una strategia chiave nel superamento dell'infezione da SARS-CoV-2 in un individuo con immuno-compromissione HIV-indotta e nel prevenire ospedalizzazione, ricovero in terapia intensiva e morte; allo stesso modo, il ripristino di una valida risposta immunitaria, con l'intervento organizzato di molteplici *subsets* di linfociti, consentendo verosimilmente di sviluppare una potenziale protezione antigene-specifica a lungo termine, pone le basi per la realizzazione di vaccini che richiamano le medesime cellule attivate in corso di infezione acuta e per un'efficace immunizzazione vaccino-indotta dei PLWH (*Patients living with HIV (infection)*) COVID-19-naïve.

La migliore arma terapeutica attualmente disponibile che avvia alla ripresa progressiva dell'immunocompetenza negli individui con infezione pregressa da HIV è la terapia antiretrovirale combinata (*cART, combination antiretroviral therapy*), un regime polifarmacologico che bersaglia differenti fasi del ciclo di replicazione di HIV, consentendo il controllo a lungo termine della diffusione del virus nell'organismo e della viremia plasmatica (*VL, viral load*) ^[38]. In questo modo, l'efficace soppressione virale farmaco-mediata concorre ad un recupero parziale dell'immunocompetenza, che si traduce, in primis, in un sensibile rialzo della conta T CD4⁺-cellulare, contestualmente ad un graduale ripristino dalle

alterazioni funzionali HIV-indotte^[5], portando nel tempo al riacquisto della piena capacità linfocitaria di rispondere efficacemente alla stimolazione da parte di Ag esterni o veicolati tramite vaccino, di attivarsi e proliferare in maniera appropriata e di eradicare potenzialmente un qualsiasi agente infettivo.

È di vitale importanza l'inizio precoce della terapia durante le prime fasi dell'infezione da HIV per puntare al conseguimento di una rapida e piena normalizzazione dei *subset* T-linfociti e, allo stesso tempo, a preservarne le funzioni^[39].

Occorre, però, considerare che, malgrado in gran parte dei soggetti con infezione da HIV la soppressione virale mediante cART conduca ad un incremento marcato della conta T CD4⁺ dopo la drammatica caduta legata all'infezione, esiste una frazione di individui sotto regime terapeutico che mostra una bassa conta T CD4⁺-cellulare persistente, a fronte di una carica virale molto bassa o non rilevabile^[25].

Le strategie vaccinali dovrebbero mirare ad indurre una risposta immune quanto più simile a quella evocata dall'infezione naturale, alla luce del ruolo cruciale svolto dall'immunità specifica T- e B-mediata, per sperare in una maggior efficacia e durata in termini di protezione, sia dall'infezione stessa che dall'esito grave di malattia^{[17]-[21]}.

I dati sull'efficacia, la sicurezza e l'immunogenicità dei vaccini a mRNA adottati durante la campagna di vaccinazione condotta nel nostro Paese (*Comirnaty* e *Spikevax*) sono stati ricavati da trial clinici di popolazione che includevano anche pazienti con infezione da HIV: i risultati hanno mostrato una notevole protezione contro l'infezione accanto ad un elevato profilo di sicurezza, con la limitazione di una valutazione e di un monitoraggio nel tempo a breve termine^{[54],[55]}.

Trials finalizzati alla valutazione del profilo di efficacia, immunogenicità, sicurezza e tollerabilità di vaccini a vettore-virale, quali *Vaxzevria* e *Janssen*, hanno, invece, evidenziato una minore efficacia protettiva contro l'infezione da SARS-CoV-2 rispetto ai composti a mRNA, sebbene rimangano, comunque, efficaci e sicuri^{[62]-[65]}.

Studi che mirano a determinare la capacità dei vaccini di indurre una risposta consistente, sia cellulo-mediata che umorale, nella popolazione con infezione da HIV sono stati pubblicati e ulteriori evidenze si vanno progressivamente aggiungendo: sono emersi risultati incoraggianti e promettenti, che supportano la necessità di sottoporre a vaccinazione questa categoria di pazienti.

1.1 Immuno-patogenesi dell'infezione da HIV ^{[5],[25]-[27]}

Il virus dell'immunodeficienza umana, che comprende due specie (HIV-1,-2) di *Lentivirus* appartenenti alla famiglia dei *Retroviridae*, infetta primariamente i linfociti T CD4⁺ effettori ed effettori di memoria (T_{EM}), che esprimono il recettore di ingresso CD4 e il co-recettore CCR5 (ceppi M-tropici), nei siti di ingresso a livello delle mucose, in particolare quella intestinale, maggior reservoir di linfociti T CD4⁺ dell'organismo; dopo l'ingresso nei linfociti, il virus ne determina una massiva e rapida deplezione, dovuta alla citolisi virus-indotta, che investe anche le cellule T CD4⁺ della memoria localizzate nel timo.

Il processo intracellulare dominante che porta alla perdita di elementi T CD4⁺-linfocitari è rappresentato dall'apoptosi mediata da *caspiasi-3*, innescata da HIV.

La distruzione linfocitaria accelerata dal virus nelle fasi precoci dell'infezione risulta controbilanciata, attraverso un processo di omeostasi, da un aumento della proliferazione delle cellule T CD4⁺ effettrici/CD45RO⁺ di memoria, provenienti dal timo, nel tentativo di mantenere il pool linfocitario.

HIV, dunque, è responsabile della deplezione delle cellule target e, nello stesso tempo, di una risposta proliferativa che si oppone alla morte cellulare per mantenere un equilibrio all'interno della popolazione CD4⁺ finché non subentra una condizione di esaurimento funzionale ^[5]; inoltre, l'incremento del tasso di divisione è di per sé un fattore che contribuisce ad espandere il pool linfocitario suscettibile di infezione.

Tuttavia, il meccanismo di apoptosi non spiega completamente la perdita di cellule CD4⁺ o CD8⁺ naïve non infettate, indicando l'esistenza di altre vie implicate nell'immuno-patogenesi della malattia da HIV.

Sebbene il bersaglio principale del virus sia il *subset* T CD4⁺, la disfunzione indotta in questa popolazione, che svolge un ruolo centrale nell'organizzazione della risposta innata e specifica contro antigeni esogeni, si riflette secondariamente nelle attività di altri citotipi (linfociti CD8⁺, B, cellule NK) che risultano alterate e/o non adeguatamente regolate.

Nel corso dell'infezione da HIV, infatti, si stabilisce uno stato di iperattivazione immunitaria generalizzata, caratterizzata da alti livelli di proliferazione delle cellule T CD4⁺ e CD8⁺, B, NK e up-regolazione dei marker di attivazione che contribuisce a chiarire in che modo cellule non infettate vadano incontro a morte in qualità di *bystander* nei confronti di HIV: si assiste ad un incremento del *turnover* e ad un'attivazione aspecifica T-cellulare e B-linfocitaria policlonale in un contesto di marcata infiammazione, con rilascio massivo di

chemochine e citochine pro-infiammatorie (tempesta citochinica), che favorisce una deplezione cellulare mediata da un'aberrante attivazione cellulare anche in cellule *virus-free*.

La connessione tra la perdita di linfociti T CD4⁺, ma anche di altre popolazioni cellulari, e l'iperattivazione è stata individuata in un processo di morte intracellulare programmata, innescato dalla *caspasi-1* (piroptosi), con il rilascio del contenuto citosolico contenente citochine pro-infiammatorie: così, le cellule andate incontro a morte inviano segnali infiammatori che stimolano altre cellule T a morire, avviando un processo di attivazione cronica che peggiora la disfunzione immuno-cellulare.

A sostenere questo processo contribuisce anche la violazione dell'integrità della barriera immunitaria localizzata nella lamina propria del GALT (*Gut-Associated lymphoid tissue*), che conduce una traslocazione scarsamente controllata di microrganismi e prodotti microbici immunostimolanti, i quali amplificano l'attivazione immunitaria cronica durante l'infezione da HIV.

Tutti i fattori citati (deplezione T CD4⁺, aumentato *turnover* cellulare, iperattivazione cronica aberrante, infiammazione, apoptosi), considerati insieme, sono responsabili di un fallimento generalizzato della risposta immune alla stimolazione da parte di antigeni microbici.

In particolare, dato che i linfociti B e/o le cellule NK non sono dei bersagli selettivi di HIV, si ritiene che le alterazioni osservate in diverse popolazioni cellulari, in corso di infezione da HIV non trattata, siano con più probabilità dovute ad una esposizione cronica agli antigeni virali, che porta a tassi elevati di *turnover* e differenziazione, esitando in una perdita funzionale e del potenziale rigenerativo (*exhaustion*), essenziale ai fini del mantenimento della competenza immunitaria.

1.1.1 Alterazioni fenotipiche e funzionali T-/B-cellulari ^{[25],[28]}

L'infezione cronica da HIV negli individui non sottoposti a terapia è contraddistinta da un'aumentata frequenza di cellule linfocitarie (T/B) con fenotipo attivato e up-regolazione dei marker di attivazione cellulare, come il CD38, sulla superficie delle cellule T CD8⁺, che correla con un maggior tasso di progressione di malattia.

Perciò, la capacità di controllare l'infezione virale non dipende dal grado di attivazione delle cellule, bensì dalla qualità della risposta: come discusso nel paragrafo 1.1, una condizione

di persistente attivazione implica una disfunzione immuno-cellulare, documentata da un maggior *turnover*, una tendenza dei *subsets* T verso fenotipi più differenziati, fino alla comparsa di fenomeni di esaurimento e (immuno-)senescenza e, in ultimo, la perdita della capacità rigenerativa.

È stato dimostrato che l'entità della risposta T CD8⁺ HIV-specifica, misurata mediante saggi basati sulla produzione intracellulare di citochine (ICS, *intracellular cytokine staining*), non si associa né indica un miglior controllo dell'infezione, ma è correlata alla carica virale di HIV: maggiore è la carica virale, più forte è la stimolazione virus-indotta sulle cellule T, anche se, a parità di dimensioni della risposta, nei soggetti che riescono naturalmente a contrastare HIV (*non progressors*), confrontati con quelli che vanno incontro a progressione di malattia (*progressors*), le cellule T esibiscono una capacità di produrre molteplici citochine effettrici (e.g. IL-2 e/o IFN- γ), caratteristica persa nei *progressors*, dove la risposta T-mediata diretta contro HIV è dominata dal rilascio sbilanciato del solo IFN- γ .

È chiaro, quindi, che la polifunzionalità cellulare è decisiva nel permettere al sistema immunitario un miglior controllo della replicazione di HIV.

È fondamentale notare che, in quest'ultimo gruppo di individui, il livello di polifunzionalità è risultato correlato alla carica virale; ne consegue che la soppressione virale tramite cART può essere determinante, permettendo una risposta T-cellulare polifunzionale associata a un minor rischio di progressione e miglior *outcome* clinico.

Un contributo all'alterazione della funzione T CD4⁺/CD8⁺-cellulare proviene dalla stimolazione antigenica cronica legata ad HIV, che induce dei *pathway* immuno-modulatori responsabili di alcuni difetti funzionali osservati tanto nei CTL (linfociti T CD8⁺ citotossici) che nei T *helper* (ridotta capacità di proliferare, produrre citochine, differenziarsi e perdita di polifunzionalità); in particolare, si ritiene che l'interazione tra PD-1, espresso sulla superficie dei linfociti T, ed il rispettivo ligando sulla superficie delle APC (*Antigen Presenting Cells*, cellule presentanti l'antigene) sia una conseguenza diretta del contatto dei linfociti T HIV-specifici con il virus, piuttosto che della generale condizione di attivazione immunitaria. In più, questa via regolatoria è centrale nel controllare l'apoptosi e partecipa attivamente a determinare un difetto di sopravvivenza delle cellule T.

L'attivazione linfocitaria persistente interessa direttamente anche i linfociti B, ulteriormente influenzati dall'effetto dell'infezione virale sui linfociti T CD4⁺: i linfociti T_{FH} (*T-helper follicolari*), che svolgono un ruolo essenziale nei processi aventi luogo nel centro

germinativo (si ricordano, tra i principali, la maturazione dell'affinità anticorpale e la differenziazione dei linfociti B antigene-specifici in cellule B memoria o plasmacellule), sono suscettibili di infezione da HIV e, andando incontro a forte espansione dopo l'ingresso del virus, si associano verosimilmente a iperplasia follicolare e ipergammaglobulinemia da aumentata differenziazione terminale dei linfociti B.

In questo modo, i difetti funzionali delle cellule T_{FH} si riflettono sull'attività B cellulare e spiegano, in parte, come il virus sia in grado di causare modificazioni a carico delle strutture follicolari all'interno dei linfonodi periferici, alterando profondamente l'interazione cruciale tra linfociti T e B per la costruzione di una efficace risposta cellulo-mediata e umorale antigene-specifica.

Accanto all'espansione dei follicoli si osserva una deposizione di collagene nelle zone T, probabilmente risultante da un processo di attivazione cronica delle cellule T, da uno stato infiammatorio e/o da perturbazioni del microambiente, che porta ad una perdita della normale architettura del reticolo fibroblastico (FRC, *Fibroblastic Reticular Cells*).

I fibroblasti reticolari sono essenziali per la sopravvivenza delle cellule $T CD4^+/CD8^+$ naïve, grazie alla produzione di fattori anti-apoptotici (e.g. IL-7) [29], perciò il danno alla rete di FCR causa sia un accesso ristretto all'IL-7 che una scomparsa progressiva della principale fonte di citochina, conducendo a maggior tasso di apoptosi e deplezione dei linfociti T naïve [30]-[34].

Cellule B isolate da pazienti con infezione da HIV e alti livelli di viremia hanno mostrato una ridotta risposta proliferativa a vari stimoli e un incremento della secrezione di immunoglobuline, suggerendo che HIV è in grado di indurre la comparsa di subset B-cellulari (che esprimono bassi livelli di CD21) con fenotipo plasmacitoide aberrante, probabilmente responsabile dell'ipergammaglobulinemia associata alla malattia da HIV [35]. È stata anche evidenziata una sottopopolazione di linfociti B memoria caratterizzata da un'elevata espressione di recettori inibitori, simili a quelli descritti per le cellule T antigene-specifiche [36] in stato di esaurimento funzionale, associati a una diminuita risposta proliferativa a varie stimolazioni. Questa evidenza indicherebbe un contributo del fenomeno di esaurimento precoce delle cellule B, legato all'infezione da HIV, ad una scarsa risposta umorale virus-specifica [37].

Dopo aver sommariamente descritto alcuni dei complessi meccanismi alla base della disfunzione e della disregolazione dell'attività T- e B-cellulare in corso di infezione da HIV,

che alterano la capacità delle cellule di controllare efficacemente la replicazione del virus e di promuoverne l'eliminazione, è necessario comprendere il ruolo della terapia antiretrovirale combinata nel favorire il recupero del pool delle cellule bersaglio specifiche di HIV e il ripristino di un'adeguata capacità di risposta integrata cellulare e umorale.

1.1.2 Terapia antiretrovirale combinata: razionale e ruolo nell'immunopatogenesi da HIV

Essendo il ciclo replicativo di HIV composto da diverse fasi (multi-step), l'associazione di farmaci che bersagliano differenti stadi del ciclo vitale stesso permette di ottenere un effetto additivo o sinergico, aumentando l'efficacia della soppressione della replicazione virale farmaco-mediata ^[38]. Sono disponibili molteplici agenti farmacologici che fanno capo a sei diverse classi, ciascuna delle quali selettiva per un determinato stadio del ciclo vitale di HIV: gli inibitori nucleosidici (*NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors*) e non (*NNRTI*) della trascrittasi inversa virale, gli inibitori della proteasi (*PI*), gli inibitori dell'integrasi (*INI*), dell'ingresso (antagonisti del CCR5 e inibitori post-legame) e, infine, della fusione. Il trattamento attualmente in uso prevede in genere due NRTI, che costituiscono il pilastro o "backbone" del regime terapeutico, in associazione ad un terzo farmaco, scelto fra NNRTI, PI, INI.

La cART mira prima di tutto al raggiungimento e al mantenimento di livelli di carica virale plasmatica non rilevabili ed al miglioramento della funzione immunitaria generale. Un aspetto importante è rappresentato dai notevoli benefici legati all'avvio della cART negli stadi precoci dell'infezione, quando non sono ancora comparse le alterazioni funzionali ed è mantenuta la capacità di proliferare e rispondere a stimoli multipli; in questo *setting* è stato dimostrato che la terapia combinata antiretrovirale è efficace nel sopprimere la replicazione di HIV fino a livelli non rilevabili, nel normalizzare il rapporto CD4⁺/CD8⁺, nel ridurre l'attivazione delle cellule T attivate (CD8⁺ CD38⁺) e nel promuovere un incremento dei linfociti T CD4⁺ effettori e di memoria. Dunque, l'inizio precoce della terapia consente una rapida e quasi completa ricostituzione del pool T CD4⁺ e la preservazione delle più importanti funzioni T-cellulari ^[39], con efficacia attesa ridotta se il trattamento è ritardato.

Bisogna ricordare, inoltre, che la cART non previene la deplezione T CD4⁺-cellulare bensì ne favorisce il recupero post-infezione, riportando talvolta la conta a livelli pre-infezione, soprattutto se viene iniziata precocemente e l'immuno-attivazione/inflammatione risultano

ben controllate ^[27]; ciononostante l'immuno-ricostituzione spesso è incompleta anche dopo anni di controllo viremico, l'attivazione generalizzata delle cellule immunitarie e l'infiammazione restano elevate e la conta T CD4⁺ non è in grado di normalizzarsi, indicando che la cART riduce ma non elimina del tutto gli effetti dell'infezione da HIV sul numero e le funzioni delle cellule linfocitarie ^{[40],[73]-[75]}.

La cART interviene variamente nei meccanismi di immuno-patogenesi: riducendo la carica virale previene la perdita di polifunzionalità delle cellule T e down-regola l'espressione del recettore PD-1, aumentata dalla stimolazione antigenica cronica da HIV; è in grado di invertire il fenotipo attivato delle cellule T linfocitarie (CD38⁺), che è correlato alla carica virale ^[28] ed induce il ripristino della rete di fibroblasti reticolari, strettamente associato alla ricostituzione della popolazione T naïve nei linfonodi, con risultato ottimale se il trattamento ha inizio in fase precoce/acuta dell'infezione ^[31].

Inoltre, contribuisce al blocco dei *pathway* inibitori coinvolti nella disfunzione delle cellule T in corso di infezione da HIV, che impedisce loro il controllo della replicazione di HIV nei reservoirs cellulari latenti ^[36], favorendone il recupero da uno stato di esaurimento funzionale.

L'effetto della terapia è evidente anche nelle cellule B dove la soppressione della carica virale si associa ad una normalizzazione delle cellule anticorpo-secerenti e delle Ig circolanti, indicando che la viremia è determinante nell'iperattivazione B-linfocitaria ^[35].

In questo modo, l'intervento della cART potrebbe favorire il ritorno ad un fenotipo normale e ad una risposta proliferativa agli stimoli più bilanciata.

Nei pazienti con infezione cronica da HIV, ad un anno dall'inizio della terapia antiretrovirale, si assiste ad un notevole incremento della conta B, accompagnato da una riduzione parallela di quelle sottopopolazioni inclini all'apoptosi: alla normalizzazione della conta B contribuiscono sia i linfociti naïve che quelli di memoria, *subsets* essenziali per la costruzione di una adeguata risposta umorale, suggerendone un potenziale miglioramento in relazione al conseguimento del controllo viremico ^[41].

Anche il compartimento delle cellule B della memoria risente positivamente dell'inizio in fase precoce di malattia della cART, che porterebbe ad un miglior profilo funzionale nelle risposte dirette contro antigeni HIV o di diversa natura ^[42].

È importante, infine, osservare che parte dei benefici sulla funzione B-cellulare sono indiretti e probabilmente attribuibili al miglioramento dei difetti della funzione T-cellulare indotto dalla cART, alla luce della stretta cooperazione esistente tra i due *subsets* linfocitari.

1.2 Infezione da SARS-CoV-2: patogenesi e coinvolgimento del sistema immunitario dell'ospite ^[16]

SARS-CoV-2, una specie della famiglia delle *Coronaviridae*, genere *Betacoronavirus*, è un nuovo coronavirus umano responsabile della pandemia da COVID-19.

Il virione consiste di un *envelope*, costituito da un doppio strato lipidico in cui sono localizzate tre proteine strutturali S (glicoproteina *Spike*), M (*Membrane*), E (*Envelope*), il quale racchiude il genoma virale legato alla quarta proteina strutturale, la proteina N (*Nucleoprotein*) del nucleocapside.

Il virus infetta le cellule dell'epitelio respiratorio, compreso quello alveolare, l'endotelio vascolare e i macrofagi riconoscendo un recettore espresso sulla membrana delle cellule target, l'ACE-2 (*Angiotensin-converting enzyme*), e legandosi ad esso mediante un dominio specifico della subunità S1 della proteina *Spike* (*RBD, Region Binding Domain*) del rivestimento esterno.

L'infezione da SARS-CoV-2 innesca una reazione immunitaria che presenta dinamiche cellulari affini a quelle di altre infezioni virali, coinvolgendo inizialmente l'immunità innata che dà il via, successivamente, alla risposta antivirale specifica cellulo-mediata e umorale: le cellule infettate espongono dapprima i peptidi virali sulle molecole HLA-1, inducendo il riconoscimento da parte di linfociti T CD8⁺, che si attivano, vanno incontro ad espansione clonale e si differenziano in linfociti T citotossici e di memoria.

I CTL e le cellule NK esplicano la propria azione antivirale provocando l'apoptosi o la lisi delle cellule infettate.

Le APC professionali, come macrofagi e cellule dendritiche subepiteliali, dopo il contatto con il virus e/o gli antigeni associati, espongono sulle molecole di HLA-2 i peptidi virali per favorirne il riconoscimento da parte delle cellule T CD4⁺: questo determina l'attivazione, la proliferazione ed il differenziamento dei linfociti T CD4⁺ in cellule T_H, effettrici e di memoria, e T_{FH}.

I linfociti B sono in grado sia di riconoscere direttamente le particelle virali e attivarsi, producendo una iniziale risposta anticorpale IgM-mediata, sia di interagire con cellule T CD4⁺ antigene-specifiche all'interno dei linfonodi.

I linfociti T_{FH} promuovono il differenziamento delle cellule B SARS-CoV-2-specifiche in effettori anticorpo-secerenti (plasmacellule che producono IgA, IgM, IgG virus-specifiche) e della memoria, responsabili dello sviluppo di una risposta anticorpo-mediata efficace diretta contro SARS-CoV-2.

Un aspetto importante dell'infezione da SARS-CoV-2 è la capacità delle proteine virali di inibire la risposta innata a più livelli, alterando la produzione di interferone e amplificando la via di segnalazione di NF-κB che conduce ad un aumento della frequenza di morte cellulare, iperinfiammazione e tempesta citochinica, che sono ritenute coinvolte nel danno tissutale immuno-mediato [43].

L'eccessiva attivazione delle cellule dell'immunità innata porta ad una rottura dell'equilibrio durante la risposta infiammatoria, esitando in un rilascio massivo di citochine e chemochine che richiamano ulteriori cellule dell'infiammazione e perpetuano il danno: questi eventi innescano un circolo vizioso, che culmina in una risposta infiammatoria sistemica non più sottoposta a regolazione, e si associano a malattia severa.

Anche l'immunità adattativa subisce profonde modificazioni, come dimostrato da un reperto caratteristico, osservato spesso nei pazienti con COVID-19 severa: la linfopenia [8]-[16], cioè la drastica caduta del numero di linfociti circolanti nel sangue periferico. Il difetto interessa molteplici popolazioni cellulari coinvolte nella risposta antivirale specifica, tra cui i linfociti T CD4⁺ di memoria, CTL CD8⁺, cellule B e NK [16],[43], suggerendo un'alterazione della funzione immunitaria a più livelli, che è correlata ad un fallimento della risposta a SARS-CoV-2, e ad una progressione di malattia e/o aumento della severità.

In considerazione del ruolo cruciale di una coordinazione T-cellulare (CD4⁺/CD8⁺) e umorale nel controllo dell'infezione nei casi di COVID-19 moderata, è verosimile che la perdita di una risposta integrata fornirebbe una minore protezione da un decorso severo della malattia [21].

È stata evidenziata una correlazione inversa tra la carica virale di SARS-CoV-2 e la conta linfocitaria T CD4⁺ e CD8⁺, che si riflette immediatamente in un aumentato rischio di progressione di malattia [44], dovuto probabilmente ad un fallimento della risposta T-mediata nel frenare la replicazione, la diffusione e la clearance del virus.

Questa evidenza è coerente anche con il riscontro nei casi severi di un aumento dell'espressione di recettori inibitori, come PD-1, che segnano l'ingresso delle cellule T in uno stato di esaurimento, contraddistinto dalla perdita della capacità proliferativa e delle funzioni effettrici [8],[43],[45],[46]. Tale condizione, causata probabilmente da una stimolazione antigenica persistente in fase iniziale di malattia, potrebbe contribuire a spiegare come una conta T-cellulare ridotta corrisponda a livelli più alti di carica virale.

L'evidenza di bassi livelli di cellule T CD4⁺ secernenti IFN- γ [11],[43], associata ad una maggiore produzione di molecole ad attività citotossica (e.g. granzima B e perforina) da parte dei linfociti T CD8⁺ attivati e ad un'elevata espressione di marcatori di esaurimento, indica ulteriormente che la disfunzione dei linfociti T_H è alla base di un'attivazione eccessiva dei CTL e del conseguente esaurimento che, insieme, potrebbero contribuire ad una ridotta risposta antivirale [45].

Inoltre, elevati titoli di anticorpi totali anti-Spike e Ig neutralizzanti hanno mostrato una correlazione positiva con la severità della COVID-19 [47],[48] e potrebbero indicare una risposta umorale difettiva, possibile espressione di una disfunzione dei linfociti T CD4⁺, incapace di contenere efficacemente l'infezione: ciò supporta l'ipotesi che una risposta non coordinata potrebbe essere insufficiente a proteggere dalle complicanze gravi della malattia. L'iperattivazione immuno-cellulare, l'abnorme risposta infiammatoria, la linfopenia e l'esaurimento funzionale che si verificano in corso di infezione da SARS-CoV-2, ricordano molto da vicino quelli osservati nell'infezione cronica incontrollata da HIV e indicano verosimilmente l'esistenza di meccanismi immuno-patogenici condivisi e la loro convergenza verso un'ampia disfunzione cellulare, che subisce gli effetti cumulativi di una coinfezione HIV/SARS-CoV-2.

1.3 Impatto della coinfezione HIV/SARS-CoV-2 sulla risposta T-cellulare [49]

Quando un soggetto HIV-sieropositivo contrae l'infezione da SARS-CoV-2 si verificano dei marcati cambiamenti nella conta di differenti tipi di cellule immunitarie circolanti che sono contraddistinti primariamente da una perdita condivisa di cellule T CD4⁺, note per i loro molteplici ruoli nel coordinare vari bracci effettrici dell'immunità e per lo sviluppo di una memoria immunologica antigene-specifica a lungo termine.

Nelle persone con HIV (PLWH) questo *subset* linfocitario subisce una drastica caduta nella fase acuta dell'infezione, seguita da un costante declino durante la malattia cronica e accompagnata da un'inversione del rapporto $CD4^+/CD8^+$, dovuto ad un'espansione di cellule T $CD8^+$ che presentano un fenotipo attivato e un'alta espressione di marcatori di esaurimento.

Questo stato disfunzionale correla con una limitata capacità di controllare l'infezione, di ripristinare la conta T $CD4^+$ e, infine, con un maggior tasso di progressione di malattia. Simili alterazioni si possono osservare durante infezione severa da SARS-CoV-2, la cui firma è la linfopenia T-cellulare, dove non solo la conta T $CD4^+$ e $CD8^+$ è ridotta ma il *subset* $CD4^+$ esibisce un profilo funzionale alterato, promuovendo la comparsa del fenomeno dell'esaurimento nei linfociti T citotossici.

Dunque, in entrambe le infezioni si evidenzia una deplezione di cellule con funzioni chiave nell'organizzazione della risposta antivirale specifica, associata ad uno stato di forte attivazione/esaurimento che potrebbe condurre all'impossibilità di controllare adeguatamente la replicazione virale.

Come nei pazienti HIV cronici, anche in quelli COVID-19 severi la conta totale B-linfocitaria diminuisce, a fronte di un incremento del numero di cellule T_{FH} ; queste osservazioni sono coerenti con il riscontro di ipergammaglobulinemia e di uno stato di esaurimento delle cellule B nei PLWH viremici (sottoparagrafo 1.1.2) e con la rilevazione di alti titoli di anticorpi totali (Spike-specifici e neutralizzanti) nell'infezione grave da SARS-CoV-2 (paragrafo 1.2), riflettendo verosimilmente una risposta umorale difettiva e inefficace.

Considerando anche la riduzione di cellule NK e di linfociti T/B memoria nel sangue periferico che caratterizza la coinfezione sostenuta da HIV/SARS-CoV-2, emerge un deficit complessivo nelle dinamiche della risposta specifica antivirale, che potrebbe portare ad un fallimento nel controllo dell'infezione virale, ad una progressione di malattia e all'impossibilità di instaurare una protezione a lungo termine.

Infine, si deve tener conto dell'iper-infiammazione e della tempesta citochinica, che sono connesse con lo sviluppo di COVID-19 severa, in pazienti HIV viremici con immuno-attivazione ed elevati livelli di citochine circolanti preesistenti ^[49]; sono necessari ulteriori studi per capire se l'immunodeficienza nell'infezione cronica da HIV possa facilitare o prevenire lo scoppio di un'abnorme risposta infiammatoria lesiva ^[4].

Dopo aver fornito un possibile modello condiviso di immuno-patogenesi per COVID-19 in soggetti precedentemente infettati da HIV, occorre comprendere le dinamiche e le caratteristiche della risposta cellulare e umorale evocata da SARS-CoV-2 in questa particolare categoria di pazienti, tenendo conto del controllo virologico tramite cART.

Indagando l'eventuale effetto sinergico della coinfezione HIV/SARS-CoV-2 sul sistema immunitario dell'ospite, emergono risultati contrastanti.

Uno studio mostra che COVID-19 amplifica notevolmente il processo di esaurimento funzionale delle cellule T, inizialmente causato da HIV, più pronunciato nei pazienti non trattati; l'incremento dei linfociti T "esauriti" si accompagna ad un abbassamento del rapporto $CD4^+/CD8^+$ e all'esacerbazione delle manifestazioni cliniche legate a COVID-19. Pertanto, l'infezione da HIV non controllata può essere ritenuta una seria comorbidità associata a COVID-19, peggiorando la funzione T-cellulare, mentre l'infezione da SARS-CoV-2 nei pazienti HIV adeguatamente trattati con cART non incide significativamente sul deterioramento dell'immunità cellulare ^[50].

Al contrario, un altro lavoro condotto su 5 soggetti HIV non ha confermato l'ipotesi che i PLWH siano a maggior rischio di complicanze severe legate a COVID-19, osservando il peggior decorso di malattia nel paziente con miglior profilo immunologico a fronte di un'infezione asintomatica nei soggetti con immunodeficienza più grave ^[51].

Una possibile spiegazione di questo ultimo risultato potrebbe essere che una risposta immune difettiva a causa dell'infezione da HIV possa prevenire la patogenesi immuno-mediata di COVID-19, dimostrandosi protettiva nei confronti di un decorso grave: infatti, nel soggetto con malattia più severa è stata rilevata una forte risposta T-cellulare, accompagnata da una marcata infiammazione, che dimostra una correlazione tra l'entità della risposta effettrice cellulare e la severità di malattia, in linea con le precedenti evidenze riguardanti gli individui sani ^{[17],[20],[23]}.

Nei soggetti più immunocompromessi, invece, il profilo di attivazione immunitaria non sembra associarsi ad un peggioramento delle manifestazioni cliniche ^[51].

In merito alla valutazione dell'entità della risposta cellulo-mediata e umorale nei pazienti HIV che hanno contratto COVID-19, le evidenze sembrano indicare che la ricostituzione immunitaria, con soppressione della viremia e ripristino parziale delle funzioni immunitarie grazie alla cART, possa colmare il divario esistente tra pazienti HIV e sani.

Un recente studio di popolazione ha indagato la sieroprevalenza tra individui con e senza diagnosi di HIV: è stata rilevata una risposta anticorpale considerevolmente più debole nei primi rispetto ai secondi e, all'interno del gruppo HIV, le concentrazioni di IgG sono risultate più basse nei soggetti con conta inferiore a 200 cellule/mm³, dove si sono osservati, peraltro, casi di COVID-19 severa [52].

Un altro lavoro, finalizzato alla caratterizzazione della risposta cellulare e anticorpale specifica a SARS-CoV-2, ha riscontrato una risposta T- e B-mediata di pari entità tra PLWH in ottimo controllo virologico (cART da più di due anni) e individui sani immunocompetenti, rilevando una correlazione tra basso rapporto CD4⁺/CD8⁺ e maggior severità di malattia; è, dunque, probabile che un'inadeguata immuno-ricostituzione possa compromettere lo sviluppo di una consistente protezione nei confronti del virus responsabile di COVID-19 [53].

L'apparente maggior incidenza di decorso severo della malattia da SARS-CoV-2 nei soggetti HIV-sieropositivi rende fortemente necessario e raccomandabile adottare misure di prevenzione mediante somministrazione di vaccini efficaci e sicuri, stabilendo una priorità più alta per quella sottopopolazione PLWH con una conta T CD4⁺ al di sotto delle 200 cellule/mm³ e/o rapporto CD4⁺/CD8⁺ basso/invertito, dove si ritiene potenzialmente ridotta la capacità di risposta antivirale rispetto ai sani.

1.4 Vaccini anti-COVID-19 disponibili in Italia: tipologie, efficacia e immunogenicità

L'Italia rientra nel piano strategico vaccinale EU per la somministrazione di vaccini anti-COVID-19 autorizzati dalla Commissione Europea, dopo approvazione e seguendo le raccomandazioni, basate sulle evidenze scientifiche, dell'EMA (*European Medicines Agency*).

I vaccini autorizzati per l'impiego nel nostro Paese sono: Comirnaty (*BNT162b2, BioNTech and Pfizer*), Spikevax (*Moderna*), Vaxzevria (*ChAdOx1 nCoV-19; AZD1222, AstraZeneca*) e Janssen (*Ad26.COV2.S, Janssen Research and Development*).

Comirnaty e *Spikevax* sono due vaccini che utilizzano un preparato a mRNA, inserito in nanoparticelle lipidiche, codificante per la forma pre-fusione, stabilizzata e di lunghezza completa della proteina Spike di membrana di SARS-CoV-2.

I primi *trials* clinici placebo-controllati condotti per testare l'efficacia, il profilo di sicurezza e tollerabilità e la capacità del vaccino di indurre una risposta immunitaria (immunogenicità), hanno mostrato una grande efficacia nel proteggere dall'infezione e da un decorso severo di COVID-19.

Comirnaty ha presentato un'efficacia protettiva pari al 95% dopo doppia dose in soggetti di età maggiore o uguale a 16 anni con 8 casi di infezione nei riceventi il vaccino contro 162 assegnati al placebo, mentre è stata raggiunta un'efficacia del 94,1% con due dosi di vaccino *Spikevax* (11 casi di infezione tra i riceventi il vaccino rispetto ai 185 tra i placebo), dimostrando la capacità dei vaccini contenenti mRNA di prevenire con successo sia l'infezione da SARS-CoV-2 che l'evoluzione verso COVID-19 severa; tuttavia, gli studi non sono stati progettati per valutare la copertura offerta dal vaccino nei confronti dell'infezione asintomatica, così come i risultati trovati si riferiscono ad un periodo di *follow-up* a breve termine dopo seconda dose^{[54],[55]}.

Per definire i correlati di protezione è necessario attendere un aumento dell'incidenza di casi di positività lontano dall'ultima dose e, contestualmente, un declino della copertura vaccino-indotta.

A tale scopo *Comirnaty* è stato valutato a 6 mesi dal completamento del programma di vaccinazione dimostrandosi, ancora una volta, altamente efficace nel prevenire l'infezione da SARS-CoV-2 (efficacia globale 91,3%; 96,7% nei confronti della malattia severa)^[56].

A conferma di questo, uno studio di coorte israeliano ha riportato una rapida e robusta risposta evocata da *Comirnaty* con una disparità nei titoli di Ig anti-RBD (*Region Binding Domain* ossia la regione della proteina Spike, espressa sull'envelope di SARS-CoV-2, deputata al legame con il recettore cellulare ACE-2) dopo la prima dose di vaccino tra individui di età maggiore di 66 anni e/o immunocompromessi; è interessante notare che tale differenza è stata in parte annullata dopo la somministrazione della seconda dose, fornendo una prova della necessità di un richiamo in certe categorie di popolazione, come quella con immunodeficienza secondaria ad infezione da HIV, per raggiungere un livello di risposta più vicino a quello dei soggetti sani.

Sono state osservate correlazioni significative tra i titoli di anticorpi anti-S e attività neutralizzante che indicherebbe un maggior potere bloccante delle Ig laddove ne risulta una più marcata secrezione; sesso maschile, età, immunodepressione e altre comorbidità correlano con una risposta umorale ridotta^[57].

Vi sono evidenze che l'immunità specifica cellulare, mediata dai linfociti T_{HI} $CD4^+$ e $CD8^+$, gioca un ruolo chiave nel controllo dell'infezione da SARS-CoV-2 [19], coordinandosi con quella umorale: una risposta altamente organizzata che coinvolge i tre bracci effettori specifici consente di contenere la diffusione del virus e proteggere dalla malattia severa, mentre un'attivazione parziale delle varie popolazioni linfocitarie si dimostra più debole e incapace di contrastare l'infezione, esitando in un decorso più grave di COVID-19 [21],[58].

In più l'innescò di una risposta T-mediata è alla base della costruzione di un'immunità di tipo memoria a più lungo termine [17] che potrebbe giocare un ruolo protettivo importante nei confronti di SARS-CoV-2 proprio al diminuire della copertura anticorpale [59].

In considerazione di ciò, un vaccino potenzialmente efficace dovrebbe essere in grado di indurre una risposta antivirale quanto più simile a quella evocata dall'infezione naturale, coinvolgendo sia l'immunità effettrice cellulare $CD4^+$ e $CD8^+$ [19] sia quella umorale, al fine di generare un presunto alto livello di protezione [21].

Per *Comirnaty* questo "requisito", verosimilmente predittivo di maggior efficacia, è stato ampiamente riconosciuto: infatti, uno dei primi *trials* [60] volto alla valutazione dei correlati di risposta dopo doppia dose di vaccino ha evidenziato una forte risposta T-cellulare, prevalentemente guidata dai linfociti T_{HI} $CD4^+$, come osservato in pazienti guariti da COVID-19 [19], con attivazione di linfociti $CD8^+$ specifici contro la RBD di SARS-CoV-2 e intenso rilascio di citochine immuno-modulatorie (e.g. IFN- γ , IL-2).

La risposta cellulo-mediata è supportata da un'elevata produzione di anticorpi neutralizzanti anti-RBD, provando che il vaccino svolge un ruolo potenzialmente protettivo nei confronti di COVID-19 attraverso meccanismi cellulari multipli e coordinati.

È da notare che i livelli di anticorpi anti-RBD raggiunti dopo seconda dose risultano significativamente più alti di quelli dei pazienti convalescenti da COVID-19 [60].

La comparazione delle dinamiche e dell'entità della risposta immunitaria, dopo infezione naturale e vaccino a mRNA, mostra nei soggetti vaccinati sani lo sviluppo parallelo di un'immunità cellulo-mediata, pilotata dal *subset* linfocitario T_{HI} $CD4^+$, e umorale molto simile a quello degli individui con precedente infezione, con una correlazione tra i due bracci effettori presente in entrambi i *setting* [58],[61]. Malgrado il vaccino sembri stimolare la produzione di livelli più alti di Ig Spike-specifiche, che correlano con una forte capacità di neutralizzare il dominio di legame della proteina S, nei guariti dall'infezione virale il potere neutralizzante delle Ig è leggermente maggiore [58].

È ormai chiaro che la vaccinazione con meccanismo a mRNA è capace di scatenare una reazione immune coordinata, dove le cellule T dirette contro SARS-CoV-2 sono fortemente supportate da una spiccata attività anticorpale neutralizzante la proteina S virale.

Un aspetto rilevante, emerso studiando gli effetti di COVID-19 sul sistema immunitario, è che la costruzione di una risposta coordinata dipende strettamente dal numero di linfociti T CD4⁺ naïve, correlato inversamente con l'età (≥ 65 anni) e il decorso clinico della malattia e, per questo, ritenuto verosimilmente fattore di rischio immunologico per *outcome* severo [21].

Pertanto, se un'attività integrata T e B-cellulare è cruciale per contrastare l'infezione sostenuta da SARS-CoV-2, gli individui che presentano valori basali di linfociti T CD4⁺ ridotti, come i soggetti immunodepressi fra cui, in particolare, quelli HIV-sieropositivi, potrebbero generare una risposta inefficace anche alla vaccinazione.

Accennando ai vaccini a vettore virale, *Vaxzevria* induce una risposta anticorpale in gran parte dei soggetti arruolati dopo 28 giorni dalla seconda dose, con un'attività neutralizzante osservata in 208 pazienti su 209 (>99%). Dopo 14 giorni dalla prima dose si registra un picco nella risposta T-mediata [62]. L'efficacia dopo seconda dose è pari a 66,7%, aumenta in caso di intervallo inter-dose più lungo e sembra mantenersi per tutto il periodo del monitoraggio (3 mesi) [63].

Infine, *Janssen* esibisce un'efficacia nel proteggere dall'infezione sintomatica già dopo 14 giorni dalla singola dose (66,9%); inoltre, risulta ancora più protettivo contro la malattia severa (76,7% dopo 14 giorni dalla somministrazione) [64]. A 57 giorni dalla somministrazione evoca nel 100% dei soggetti esaminati una risposta anticorpale costituita da varie sottoclassi di Ig, dotate di attività legante i recettori Fc dei fagociti e di altre proprietà antivirali anticorpo-mediate.

Analogamente ai vaccini a mRNA si evidenzia una risposta T_{H1} CD4⁺-guidata, con livelli di IFN- γ correlati ai titoli di anticorpi S/RBD-specifici e all'attività neutralizzante, suggerendo un coordinamento dei bracci effettori cellulare e umorale. L'identificazione di cellule CD4⁺/CD8⁺ esprimenti un fenotipo memoria indica lo sviluppo di una potenziale protezione duratura [65].

2. OBIETTIVI DELLA TESI

Il presente lavoro nasce con l'intento di fornire un contributo alla comprensione ed al miglioramento delle conoscenze finora raggiunte in merito alla risposta cellulo-mediata e umorale in pazienti HIV-infetti sotto pieno controllo viremico mediante terapia antiretrovirale, subito dopo somministrazione di un vaccino anti-COVID-19 basato su meccanismo a mRNA o vettore virale. Il gruppo di PLWH, infatti, presenta un profilo immunologico alterato che rende difficile predire quale sia la risposta della "macchina immunitaria" specialmente nei confronti di un antigene sconosciuto e completamente nuovo cui non è mai stata esposta, quale il peptide S derivante dalla proteina omonima espressa sull'*envelope* di SARS-CoV-2.

Pertanto, il nostro obiettivo principale è quello di valutare come il gruppo di PLWH, virologicamente soppresso grazie al trattamento combinato antiretrovirale, risponde all'inoculo di un antigene ignoto considerando gli indicatori di attività linfocitaria T (IFN- γ) e B (anti-S Abs). Comunque, nonostante una piena soppressione della viremia, accompagnata da un rialzo della conta dei linfociti T CD4+ per effetto della cART [66]-[72], durante l'infezione cronica da HIV possono persistere indefinitamente un'immuno-attivazione/infiammazione e una disfunzione cellulare [40] potenzialmente capaci di condizionare in maniera variabile la dimensione della risposta T-mediata e umorale alla stimolazione antigenica; perciò, è lecito supporre che si sviluppi una risposta di intensità paragonabile a quella di un soggetto non immunodeficiente oppure di ampiezza ridotta, per complessi eventi immunopatologici che si stabiliscono a seguito dell'interazione costante tra sistema immunitario dell'ospite e HIV.

A tal proposito, viene selezionato un campione di partecipanti sani non-HIV che fungerà da Controllo: in questo modo si tenta di determinare se le risposte cellulare e umorale nei PLWH mostrano differenze statisticamente significative oppure sono equiparabili alle corrispettive osservate in soggetti sani. Per prima cosa, aliquote di sangue intero di ogni soggetto sono stimulate con peptidi N (nucleocapside) ed S (Spike) di SARS-CoV-2 e, dopo un periodo di incubazione, viene misurata la concentrazione di IFN- γ , prodotto dalle cellule T antigene-specifiche, tramite una metodica immunoenzimatica automatizzata ELISA a sandwich. Le concentrazioni di IFN- γ sono poi messe in relazione con le concentrazioni di anticorpi anti-S e, infine, valutate rispetto al tempo trascorso dall'ultima dose di vaccino.

Così, in entrambi i gruppi di soggetti esaminati, oltre a definire il livello (ampiezza) raggiunto dalle due risposte, cellulare e umorale, si indaga l'esistenza di una relazione tra esse e la loro permanenza nel tempo cioè l'evoluzione (stabilità o decremento) entro un intervallo temporale di settimane, a partire dall'ultima somministrazione di vaccino.

Praticamente, si ricerca un modello, basato sui dati, adatto a prevedere un andamento teorico della risposta post-vaccinazione a una certa distanza di tempo dall'ultima dose e, contestualmente, a stimare e/o predire l'entità dell'attivazione T- e B-cellulare a seconda del riscontro su campioni ematici delle concentrazioni di IFN- γ e dei valori di anticorpi anti-S, rispettivamente.

A questo punto, caratterizzati entrambi i tipi di risposte alla vaccinazione anti-COVID-19, si effettua il confronto tra i due gruppi per stabilire se essi differiscono in relazione alla portata della risposta immunitaria specifica al peptide S. In particolare, si conduce un'analisi statistica comparativa con l'ausilio dei metodi della statistica inferenziale, per valutare se la risposta dei PLWH all'immunizzazione, indotta dal vaccino anti-COVID-19, risulti più debole o altrettanto robusta/consistente rispetto al controllo pienamente immunocompetente e, quindi, verificare se l'efficacia del vaccino nel suscitare una reazione contro l'Ag di interesse si dimostra paragonabile o sensibilmente/profondamente difforme a seconda del gruppo in cui viene esaminata.

Non conoscendo a priori il risultato, ci si pone nella prospettiva di ricercare dei legami tra le concentrazioni di IFN- γ , di anticorpi anti-S e le variabili appartenenti al campione PLWH candidate, per ipotesi, ad avere un impatto potenziale sull'andamento della risposta immune specifica alla vaccinazione standard.

In base ai risultati ottenuti dall'analisi multivariata, ci si propone di definire se l'entità della risposta T-mediata e umorale alla vaccinazione, registrata nel campione HIV, dipende o meno dall'effetto/intervento di variabili temporali e/o immunofenotipiche, provando dal punto di vista statistico il loro coinvolgimento nel modificare gli *outcomes* cellulo-mediati e umorali rispetto a individui non immunologicamente compromessi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento, criteri di inclusione nello studio e classificazione dei partecipanti arruolati

In questo studio sono stati inclusi soggetti affetti da HIV che rientrano nei seguenti criteri:

1. tutti i pazienti con diagnosi di infezione da HIV in trattamento a lungo termine con cART, con pieno o soddisfacente controllo della carica virale e, dunque, per la maggior parte immunologicamente stabili;
2. nel gruppo di soggetti HIV-positivo rientrano sia soggetti vaccinati non esposti al virus SARS-CoV-2 (VNE), sia pazienti vaccinati, ma precedentemente venuti a contatto con il virus (VE), che costituiscono un gruppo minoritario.
3. i controlli si considerano individui sani e, comunque, non affetti da patologie legate a uno stato di immunodeficienza; questi soggetti non sono mai stati esposti al virus e sono vaccinati con doppia dose.

I campioni di sangue intero di tutti i soggetti inclusi nello studio sono stati interamente processati presso il laboratorio della SOSD Immunologia Clinica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona garantendo l'uniformità e la confrontabilità dei risultati, ottenuti mediante l'impiego delle stesse metodiche.

Il gruppo di pazienti HIV+ è composto da 129 soggetti che vengono ripartiti e selezionati come segue:

- 15 individui hanno contratto l'infezione da SARS-CoV-2 di cui 8 hanno ricevuto due somministrazioni di vaccino *Comirnaty* (Pfizer/BioNTech), tre (3) una singola dose del medesimo e 4 non sono stati sottoposti ad alcuna somministrazione; del totale, solo coloro che hanno ricevuto almeno una dose (11) sono riconosciuti idonei all'inclusione all'interno dello studio limitatamente a quanto attiene alla valutazione di una risposta immune con spettro allargato ossia diretta contro due bersagli: il virus e il peptide virale introdotto con il vaccino; tuttavia, questo numero ristretto di soggetti (vaccinati e con precedente infezione) andrà a comporre una minoranza esaminata a parte, come già anticipato nelle righe precedenti.
- 114 individui non esposti a SARS-CoV-2, virologicamente soppressi mediante cART, sottoposti ad almeno una dose di vaccino o giunti al completamento del ciclo vaccinale: 108 soggetti hanno ricevuto il vaccino *Comirnaty* (Pfizer/BioNTech), 2 soggetti *Spikevax* (Moderna), 3 soggetti *Vaxzevria* (AstraZeneca), 1 soggetto *Janssen*

(Johnson & Johnson) e, infine, un solo soggetto ha ricevuto una vaccinazione eterologa *Comirnaty* e *Vaxzevria*.

Il gruppo di controllo è rappresentato da 73 dipendenti dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona che hanno liberamente e volontariamente aderito ad un programma di monitoraggio della risposta cellulo-mediata e umorale a SARS-CoV-2 dopo completamento del ciclo vaccinale ed è composto esclusivamente da soggetti mai venuti a contatto con SARS-CoV-2 e immunizzati attraverso la vaccinazione. I controlli vengono considerati negativi per storia clinica di immunodeficienza di qualsiasi natura o patologie riconosciute come potenzialmente in grado di pregiudicare la risposta alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2.

I soggetti guariti da COVID-19 vengono identificati mediante il dosaggio plasmatico di anticorpi diretti contro la proteina N di SARS-CoV-2 e la determinazione della concentrazione di IFN- γ dopo esposizione al peptide N virale.

La tabella sottostante (tabella 1) fornisce un quadro riassuntivo della distribuzione dei soggetti all'interno di ciascuna popolazione di cui sopra rispetto allo stato di vaccinazione anti-SARS-CoV-2 e alla positività per una precedente infezione mediata dallo stesso virus.

| Carattere | Popolazioni di riferimento | |
|---|----------------------------|----------------------|
| | PLWH ($n=129$) | Controlli ($n=72$) |
| Vaccinazione \pm Esposizione pregressa a SARS-CoV-2 | | |
| Vaccinati - Non Esposti ^a | 114 | 72 |
| Vaccinati - Esposti ^b | 11 | 0 |
| Non Vaccinati | 4 | 0 |

Tabella 1. La tabella mostra brevemente lo stato vaccinale dei soggetti delle due popolazioni, PLWH e Controlli, con riferimento alla presenza/assenza di storia clinica positiva per infezione da SARS-CoV-2 prima della somministrazione. Abbreviazioni: PLWH, people living with HIV.

^a I vaccinati negativi per precedente infezione da SARS-CoV-2 formano il gruppo principale, oggetto di indagine di questo lavoro.

^b I soggetti venuti a contatto con SARS-CoV-2 e successivamente vaccinati rappresentano un gruppo autonomo che riveste importanza marginale all'interno del disegno di studio e, per questo, non analizzato.

Per quanto riguarda lo schema di vaccinazione, non si effettuano distinzioni ai fini dello studio tra vaccinazione omologa ed eterologa con doppia dose e vaccinazione monodose a

mRNA o vettore virale. I dettagli, riportati puramente a scopo di completezza, vengono presentati nel sottoparagrafo 4.1.2.

La data dei prelievi ematici per l'esecuzione dei test di laboratorio di interesse (rilevazione e quantificazione della concentrazione di IFN- γ e determinazione del titolo di anticorpi circolanti anti-S) viene fatta coincidere con il giorno esatto di svolgimento degli stessi test; tuttavia, nei due gruppi le rilevazioni vengono effettuate dopo un periodo differente a partire dall'ultima dose della vaccinazione standard e solo un paziente, appartenente al gruppo HIV, viene sottoposto a monitoraggio prima della seconda dose e, per questo, non considerato nella statistica descrittiva della variabile "Tempo da ultima dose".

3.2 Fonte dei dati

3.2.1 Casistica studiata

I dati raccolti relativi al profilo immuno-fenotipico dei PLWH risalgono tutti al controllo clinico immediatamente successivo o più ravvicinato al periodo di completamento del ciclo vaccinale, in prossimità del quale vengono effettuati i prelievi di controllo e la processazione dei campioni. Ciò permette di far combaciare cronologicamente la rilevazione dei parametri immunologici con l'epoca del prelievo ematico di controllo e della processazione dei campioni post-vaccino affinché i risultati, ottenuti dagli immuno-dosaggi dopo vaccinazione, si riferiscano allo stato immunologico del paziente nel medesimo periodo (e.g. conta T CD4⁺, conta T CD8⁺). Ove non disponibili dati risalenti a tale periodo si adottano quelli relativi al controllo più recente.

Nei PLWH i dati sociodemografici, clinici (non riportati) e di laboratorio relativi a: età dei pazienti, anno della diagnosi di infezione da HIV, regimi di trattamento antivirale in atto, carica virale (VL, *viral load*) e profilo immunofenotipico individuale provengono tutti dalle cartelle cliniche di ogni singolo paziente, conservate nell'archivio del laboratorio della SOSD Immunologia Clinica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona e visionate con la massima riservatezza in accordo con la Legge 31 dicembre 1996, n. 675 - "Tutela delle persone e di altri soggetti rispetto al trattamento dei dati personali", l'Art. 622 C.P. e l'Autorizzazione al trattamento dei dati idonei a rivelare lo stato di salute e la vita sessuale (Autorizzazione n. 2/2008)".

Tutti i partecipanti appartenenti al gruppo dei Controlli vengono ritenuti negativi all'infezione da HIV secondo quanto espresso da essi al momento della sottoscrizione dell'autodichiarazione sul loro stato di salute.

3.2.2 Immuno-dosaggi

I dati su presenza e livelli di anticorpi diretti contro la proteina del nucleocapside (N) e contro la proteina spike (S) di SARS-CoV-2 vengono forniti dalla SOSD Virologia e dalla SOD di Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona. La valutazione della risposta cellulo-mediata tramite produzione di IFN- γ è stata effettuata presso la SOSD Immunologia Clinica. La metodica utilizzata a tale scopo è una tecnica immunoenzimatica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) automatizzata a sandwich, eseguita dopo stimolazione dei campioni biologici con peptidi di SARS-CoV-2. La procedura di stimolazione dei campioni con peptidi avviene come di seguito descritto: I campioni di sangue intero, giunti in eparina, vengono stimolati per 24 ore, a 37°C e 5% di CO₂, con peptidi N e S di SARS-CoV-2. Vengono utilizzati pool di peptidi liofilizzati (PepTivator®SARS-CoV-2, Myltenyi Biotech, Germania) costituiti da sequenze aminoacidiche che corrispondono a:

- 1) il dominio di sequenza amminoacidica 689-895 della glicoproteina di superficie S di SARS-CoV-2 (*PepTivator®SARS-CoV-2 Prot_S+*)
- 2) i domini di sequenza immunodominante selezionati della proteina spike: amminoacidi 304-338, 421-475, 492-519, 683-707, 741-770, 785-802, 885-1273 (*PepTivator®SARS-CoV-2 Prot_S*)
- 3) il dominio S1 N-terminale completo di amminoacidi 1-692 (*PepTivator®SARS-CoV-2 Prot_S1*)
- 4) la sequenza completa della fosfoproteina del nucleocapside (N) di SARS-Coronavirus- 2 (*PepTivator®SARS-CoV-2 Prot_N*)

La stimolazione in vitro di cellule T antigene-specifiche con PepTivator®Peptide Pools induce la secrezione di citochine effettrici e l'up-regolazione dei marcatori di attivazione, che consentono la rilevazione e l'isolamento delle cellule T antigene-specifiche.

Dopo l'incubazione, i sopranatanti (plasma) sono stati analizzati per testare la produzione di interferone- γ (IFN- γ) con metodica ELISA a sandwich (DRG International, Srl, Italia).

3.3 Analisi Statistica

3.3.1 Metodologia statistica in sintesi

L'analisi statistica dei dati viene organizzata e strutturata in relazione agli obiettivi esposti nel Capitolo 2.

In questo paragrafo vengono presentati i metodi, le procedure analitiche e il razionale alla base di ogni fase analitica, condotta con il fine di fornire una risposta, basata sui dati raccolti, ai quesiti da noi definiti come *end-points* all'inizio del lavoro.

Per la descrizione statistica dei dati si ricorre agli indici dispersione più comunemente utilizzati quali la media, associata al rispettivo intervallo di confidenza (CI), la deviazione standard, la mediana e l'intervallo (o range) interquartile nel caso si tratti variabili continue; le variabili nominali categoriche vengono presentate mediante le frequenze relative corrispondenti.

Nei procedimenti di inferenza statistica per effettuare un paragone tra variabili continue e stabilire la presenza o meno di differenza significativa, nell'ambito dello stesso campione (dati appaiati), si ricorre al t-test (parametrico) e al test di Wilcoxon (non parametrico) per conferma, entrambi a due code.

Il confronto statistico tra variabili continue appartenenti a gruppi (campioni) differenti viene eseguito attraverso il test non parametrico di Mann-Whitney (U-test) per dati indipendenti (ovvero non appaiati), oppure il test parametrico T di Student per la verifica d'ipotesi tra due medie campionarie, entrambi bilaterali. Si ricorre, invece, al test non parametrico di Kruskal-Wallis (con eventuale metodo del confronto multiplo di Dunn) per la comparazione tra più di due gruppi. Le frequenze relative con cui si presentano le variabili categoriche vengono confrontate mediante test del Chi-quadro.

Le relazioni esistenti tra le variabili continue vengono indagate dapprima plottando i dati all'interno di un grafico a dispersione (*scatterplot*) e valutandone visivamente la disposizione, poi calcolando il coefficiente di correlazione di Spearman (test non parametrico di correlazione per ranghi) oppure la retta di regressione che descrive la dipendenza lineare di una variabile dipendente (Y) rispetto ad una variabile indipendente (X) (regressione lineare univariata o semplice).

Le correlazioni emerse dai grafici vengono sintetizzate in una matrice di correlazione, che mostra in una tabella tutte le combinazioni tra variabili esaminate riportandone i rispettivi

indici di correlazione (r_s o ρ di Spearman) e i valori di p , ottenuti dal test non parametrico di Spearman, indicativi di una correlazione statisticamente significativa o meno tra variabili.

La dipendenza lineare teorica viene descritta da una retta (di regressione) specificandone l'indice di determinazione R^2 per definire la bontà d'adattamento (*goodness of fit*) del modello di regressione lineare univariata al dataset.

Per approfondire le correlazioni trovate e verificare se una o più variabili abbiano un peso significativo nel predire un certo tipo di risultato (ad esempio l'esito della risposta cellulomediata e/o umorale) si effettua un'analisi di regressione logistica uni- o multi-variata di tipo binario, scegliendo a priori un esito (variabile di risposta) in funzione di una variabile indipendente continua: la funzione di regressione logistica esprime mediante uno o più coefficienti di regressione (β) e i relativi rapporti di probabilità (OR, *odds ratio*) l'effetto che la variabile esplicativa – e un suo incremento definito arbitrariamente – esercita sulla probabilità che si verifichi l'evento scelto; la relazione diretta o inversa tra le due variabili è indicata dal segno di β , positivo o negativo, rispettivamente e dal relativo OR, maggiore o minore di 1; se l'OR risulta uguale a zero, allora la variabile esaminata non ha rapporti con l'evento.

La significatività di β è espressa mediante il rispettivo *p-value*, ottenuto dal test di Wald.

Dove non diversamente specificato, il livello di significatività (α) dei test statistici impiegati è fissato a 0,05 e si considera statisticamente significativo un *p-value* < 0,05.

3.3.2 Struttura dell'analisi statistica: razionale e fasi

Il presente paragrafo intende illustrare in maniera dettagliata il ragionamento logico alla base dell'analisi statistica dei dati, della formulazione delle varie fasi di cui essa si compone e gli obiettivi che si intendono raggiungere ad ogni step, i quali ricalcano quelli da cui prende spunto il lavoro stesso (si rimanda al Capitolo 3.).

L'analisi condotta sui dati si articola in diverse fasi:

1) *Statistica descrittiva e inferenza sulle popolazioni di PLWH e di individui sani*

In primo luogo, si studia l'andamento in media e la variabilità intra-gruppo della risposta immune nei due campioni determinando, successivamente, anche l'intervallo attorno la media campionaria entro cui sarebbe compresa la media dell'intera popolazione (universo) dei PLWH e dei Controlli in modo da generalizzare il risultato ottenuto da un campione di n soggetti: si descrive la

statistica dei valori di IFN- γ e quella della concentrazione di anticorpi anti-S, misurandone la variabilità e precisandone la distribuzione, poi si effettua una stima intervallare della Media della popolazione attraverso gli strumenti della statistica inferenziale (calcolo dell'intervallo di confidenza della Media); così facendo si delinea un modello che esprime quantitativamente come, in media, l'immunità specifica reagisca al vaccino nel prototipo di paziente HIV, sotto regime antiretrovirale combinato e in pieno controllo virologico, e nel Controllo sano, permettendo il successivo raffronto statistico tra gruppi;

2) *Confronto statistico intra-gruppo della risposta T-cellulare rispetto ai valori di riferimento*

Una volta caratterizzata la risposta delle cellule T CD4⁺ al vaccino anti-SARS-CoV-2 è necessario stabilire di che entità essa sia, paragonandola ai livelli minimi e massimi di riferimento che esprimono, rispettivamente, l'assenza o, al contrario, la rilevazione di una effettiva attività T-cellulare; infatti, per definire un livello di attività linfocitaria T CD4⁺ che indichi un'avvenuta risposta più o meno marcata occorre specificare il comportamento del marker corrispondente (concentrazione di IFN- γ in risposta alla stimolazione con peptide S) rispetto al *baseline*, fornito dalla stimolazione *in vitro* delle medesime cellule con antigeni generici effettuata su aliquote di controllo; ciò equivale a stabilire se c'è o meno evidenza di una differenza statisticamente significativa tra i limiti inferiori e superiori di attività T-cellulare osservata *in vitro* e i valori misurati *in vivo*, dopo stimolazione con antigene S di SARS-CoV-2.

In sintesi, valutiamo se i valori di IFN- γ rilevati sul campione PLWH siano compatibili o meno con l'evidenza di una reazione dell'immunità adattativa alla vaccinazione e quanto si discostano dai livelli di riferimento.

3) *Studio di correlazione e regressione logistica tra indicatori di risposta cellulo-mediata e umorale all'interno dei due campioni.*

In questa fase si analizzano le variabili relative alla risposta cellulo-mediata e umorale ricercando eventuali relazioni che regolano l'andamento dell'una al variare dell'altra. In più, entrambe vengono messe in relazione al "Tempo" trascorso dall'ultima somministrazione di vaccino al fine di valutarne lo sviluppo progressivo nel tempo.

La presenza di un legame di interdipendenza o dipendenza lineare semplice si esprime, rispettivamente, attraverso il coefficiente di correlazione ρ di Spearman oppure della retta di regressione più appropriata ai dati.

In considerazione delle correlazioni osservate, attraverso un modello di regressione logistica semplice o multipla si verifica se la variabile “tempo da ultima dose” abbia un ruolo predittivo significativo nei confronti di un certo esito di risposta cellulare o umorale e, analogamente, se le concentrazioni di IFN- γ siano associate o meno ad un aumento o diminuzione della probabilità di misurare livelli di anticorpi anti-S compatibili con una robusta risposta e viceversa. Da questo possiamo desumere il potere predittivo di una variabile sull’esito (scelto a priori) della risposta adattativa SARS-CoV-2-specifica, dopo aver scoperto una correlazione che le lega entrambe. Tracciati i vari grafici ed effettuati i vari calcoli, i risultati delle correlazioni vengono riportati in maniera schematica nella matrice omonima mentre quelli della regressione logistica sono raccolti in una tabella che include l’OR, il rispettivo CI 95% e il *p-value* associato.

4) *Confronto statistico di variabili tra gruppi distinti.*

Successivamente, dopo aver chiarito come avviene, in media, la risposta immunitaria cellulo-mediata e umorale distintamente nei due gruppi e quali sono i tipi di relazione esistente tra gli indicatori di attività corrispondenti, IFN- γ e titolo di anticorpi anti-S, ci si avvia alla fase che rappresenta il core dell’analisi: il confronto delle variabili suddette tra due gruppi che differiscono per stato di salute del sistema immunitario cioè i pazienti con infezione documentata da HIV da un lato, gli individui con funzione immunitaria pienamente conservata dall’altro. Questa parte di statistica comparativa riveste un ruolo d’importanza fondamentale poiché permette di affermare se esiste o meno una differenza statisticamente significativa nell’entità della risposta adattativa valutata sui due versanti, cellulare e umorale, in due gruppi diversi. Applicando un test di *comparison* di tipo non parametrico come il Test-U di M-W (si rimanda alle righe precedenti di questo paragrafo) e in base al *p-value* ottenuto, si può concludere che il vaccino anti COVID-19 innesca nel gruppo PLWH una reazione da parte dell’immunità adattativa statisticamente comparabile o divergente rispetto ad un gruppo di Controllo sano.

Tuttavia, pur conoscendo l'esito della risposta immune al vaccino in presenza di alterazioni cellulari numeriche e funzionali che caratterizzano il campione PLWH, non sappiamo esattamente se e in che modo concorrano a determinare la portata della risposta misurata. Pertanto, si indagano eventuali relazioni tra i marcatori di risposta e le variabili gruppo-specifiche nella successiva fase, allo scopo di contestualizzare e interpretare i risultati in considerazione dello stato di salute del sistema immunitario in presenza di infezione da HIV controllata farmacologicamente.

5) *Analisi di correlazione e regressione logistica delle variabili relative alla risposta T-cellulare e umorale rispetto a quelle gruppo-specifiche in PLWH.*

Questa ultima fase è incentrata nello studio delle variabili di risposta adattativa (concentrazione di IFN- γ e di anticorpi anti-S) in rapporto ad altre variabili generali (età alla diagnosi e tempo trascorso dalla diagnosi di infezione alla data di arruolamento) e immunofenotipiche (conta T CD4⁺ più recente e relativo *nadir* – valore minimo nella conta raggiunto nel corso della storia clinica, prima dell'inizio della terapia antiretrovirale combinata –, rapporto CD4⁺/CD8⁺) nel gruppo PLWH. La scelta di valutare l'esistenza di un nesso statistico tra quest'ultime ed i marcatori di risposta immune specifica al vaccino è motivata/dettata dall'influenza che hanno nella cinetica di sviluppo, nell'evoluzione e nell'efficacia della medesima risposta ad un qualsiasi Ag esogeno, sia infettivo (naturale) che di sintesi, come quello introdotto tramite vaccinazione anti SARS-CoV-2.

L'obiettivo è stabilire se lo sviluppo di una certa risposta adattativa al vaccino in tali soggetti sia associato a fattori riguardanti il tempo di esposizione al virus ed i parametri di funzionalità immunitaria che intervengono nel condizionarne gli esiti, diversamente dai partecipanti sani.

Da un punto di vista pratico si valutano le correlazioni tra due o più variabili attraverso modelli multivariati adatti a descrivere la variazione della concentrazione di IFN- γ e/o del titolo di anticorpi anti-S al modificarsi di una variabile indipendente ritenuta potenzialmente implicata nello sviluppo di una risposta specifica al vaccino. Per indagare nel dettaglio l'associazione tra una variabile e un *outcome* di risposta specifica anti-S si applicano modelli di regressione logistica semplice per più variabili: essi permettono di stimarne il ruolo come fattori predittivi indipendenti dell'entità della produzione di IFN- γ e di Ig anti-S.

Inoltre, le risposte T- e B-mediate vengono stratificate in base alla conta T CD4⁺ e poi messe a confronto tra loro e con i soggetti sani per comprendere quanto il numero assoluto delle cellule CD4⁺ sia determinante nello sviluppo di una robusta risposta adattativa al vaccino. Allo stesso modo il carico plasmatico di anticorpi anti-S e le concentrazioni di IFN- γ vengono assegnati a due gruppi secondo valori di *nadir* CD4⁺ minori o maggiori/uguali a 200 cellule/mm³, comparando le dimensioni della risposta specifica attuale al vaccino, umorale e cellulo-mediata, in relazione al massimo livello di immunodeficienza raggiunto in passato.

Infine, si studia l'effetto/impatto del fattore anagrafico e del tempo trascorso dalla diagnosi di infezione da HIV sulle dimensioni della risposta in differenti classi d'età. Al termine dell'analisi si sarà in grado di constatare se e quali fattori abbiano un ruolo più o meno decisivo nel guidare la reazione immune specifica vaccino-indotta.

Tutti i risultati dell'analisi di correlazione vengono mostrati graficamente mediante dei grafici a dispersione e inseriti, al termine dell'analisi, nella matrice di correlazione, mentre per la regressione logistica viene costruita una tabella che riassume i calcoli relativi all'OR – e al suo CI 95% - e al *p-value* per ogni variabile.

3.3.3 Materiali e modalità di presentazione dei risultati

Pacchetti software statistici utilizzati per i fogli di calcolo, i grafici, l'analisi e l'elaborazione dei dati: Prism v.9.0.2 (GraphPad by GraphPad Software, Inc.), Minitab (by Minitab, LLC), Microsoft Office Excel (by Microsoft Corporation)

Presentazione dei risultati nella statistica descrittiva: variabili continue riportate sottoforma di media \pm DS e 95% CI (intervallo di confidenza) oppure come *five number summary*, approccio che adotta come indici descrittivi di posizione, per ciascuna variabile continua, la mediana, la media, il range interquartile (IQR), il valore massimo e quello minimo; le variabili nominali categoriche vengono presentate come *n* ed eventualmente espresse anche in percentuale *n* (%).

I risultati degli statistica-test sono da considerarsi, dove non altrimenti specificato, significativi per $p < 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche dei campioni di popolazione esaminati

4.1.1 Aspetti sociodemografici della casistica

La popolazione studiata è complessivamente costituita da 187 soggetti, di cui 114 PLWH e 73 controlli.

| Variabili | Campioni studiati | |
|----------------|-------------------|------------------|
| | PLWH (n=114) | Controlli (n=73) |
| Sesso (M; F) | 78; 36 | 21; 52 |
| Sesso M; F (%) | (68; 32) % | (29; 71) % |
| M/F | 2,17 | 0,404 |
| Età media | 55,1±9,24 | 45,3±11,4 |

Tabella 2. Caratteristiche generali dei campioni esaminati.

Si apprezza una differenza nella distribuzione dei sessi tra le popolazioni campionarie: gli individui di sesso femminile sono distribuiti approssimativamente in modo omogeneo, mentre quelli di sesso maschile sono nettamente più rappresentati nel gruppo HIV+; infatti, il rapporto tra individui di sesso M e F è pari a 78/36 (>2) e 21/52 (<0,5) nel gruppo di individui HIV-infetti e in quello di controllo, rispettivamente. La frequenza relativa del sesso M, espressa in percentuale (Maschi %), è pari al 67.7% del totale nel primo gruppo mentre nel secondo gruppo gli individui di sesso M sono il 29.0%.

In ultimo si fornisce un ulteriore dato circa la carica virale (VL, *viral load*) nel campione PLWH sottoposto a trattamento antiretrovirale altamente efficace a lungo termine. Tutti i pazienti risultano virologicamente soppressi con VL non rilevata o <20 copie/ml eccetto quattro, che presentano una VL compresa nel range 20-100 (3) e 500-1000 (1) copie RNA/ml. Perciò 110 pazienti su 114 (96,5%) si trovano in una condizione di pieno controllo della replicazione virale.

4.1.2 Schemi di vaccinazione relativi ai partecipanti

La coorte di soggetti posti sotto studio risulta completamente vaccinata con i Controlli immunizzati mediante doppia dose del vaccino a mRNA Comirnaty (Pfizer) e i PLWH sottoposti a singola o doppia dose secondo il seguente schema: dei 114 componenti, 107 hanno ricevuto due dosi del vaccino a mRNA *Comirnaty*, due una doppia dose di *Spikevax*

(Moderna), altri due doppia somministrazione di *Vaxzevria* (AstraZeneca) e, infine, uno soltanto una singola dose del vaccino *Jansenn*.

Dei restanti due pazienti, uno ha ricevuto un'unica somministrazione del vaccino *Vaxzevria*, l'altro due dosi differenti di vaccino (vaccinazione eterologa *Vaxzevria* + *Comirnaty*).

La tabella 3 illustra i dettagli della vaccinazione nei PLWH.

| Variabili legate alla vaccinazione | PLWH (n=114) | Controlli (n=72) |
|--|--------------|------------------|
| Regime completo, n | | |
| Vaccinazione omologa | 113 | 72 |
| Comirnaty | 107 | 72 |
| Spikevax | 2 | - |
| Vaxzevria | 2 | - |
| Jansenn | 1 | - |
| Vaccinazione eterologa (Vaxzevria+Comirnaty) | 1 | - |
| Monodose (Vaxzevria) | 1 | - |

Tabella 3. Schema di vaccinazione della coorte di pazienti studiati.

Il gruppo di pazienti HIV risulta prevalentemente immunizzato con doppia dose di vaccino a mRNA in una percentuale pari al 96.5% del totale.

4.1.3 Età e tempo trascorso dall'ultima vaccinazione fino al momento della rilevazione

Per quanto riguarda l'età, la statistica descrittiva mostra che il gruppo dei pazienti HIV-positivi ha, in media, 54,6 anni mentre nel gruppo di controllo l'età media è più bassa, attestandosi su un valore di 45,3 anni. Esaminando più da vicino e in maniera più dettagliata la variabile casuale (V.C.) "Età" nei due gruppi si possono evidenziare differenze nella distribuzione dei valori vicino al valore medio, risultando maggiormente concentrati attorno alla media nei pazienti con HIV (54.6±9.23 anni) rispetto ai Controlli (45.3±11.4 anni).

Si può concludere, perciò, che la variabile considerata presenta una variabilità intorno al valore medio minore nel primo gruppo rispetto al secondo.

Nel gruppo PLWH si registra un'età massima di 81 anni e un minimo di 27 anni, con metà dei valori localizzata attorno ad una mediana pari a 55.5 anni e all'interno di un intervallo interquartile compreso tra i 49.0 e i 60.0 anni circa (IQR~11.0). L'età massima nei Controlli raggiunge i 69.0 anni mentre quella minima si ferma a 24.0; il 50% dei valori è concentrato in un intervallo interquartile che va da 37.0 a 53.0 anni (IQR~16.0) dove la mediana ricade

a 45.5 anni. Perciò gli individui sani sono, sia in media che in mediana, più giovani rispetto a quelli con diagnosi pregressa di HIV con una differenza che si approssima a 9 o 10 anni a seconda degli indici considerati, rispettivamente.

La figura 1 illustra graficamente le differenze in età riscontrate nei due gruppi

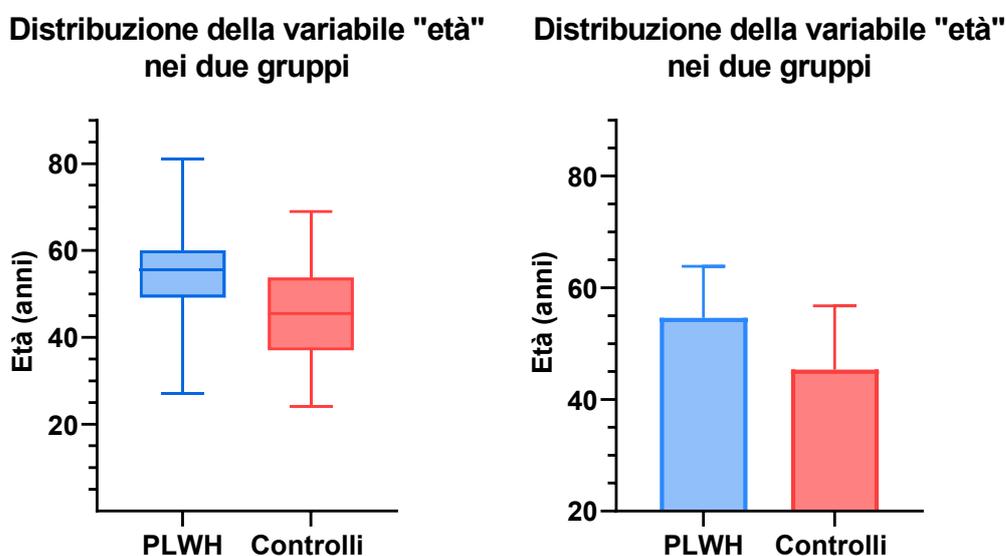


Figura 1. Box-plot e grafico a barre che descrivono la distribuzione dell'età nel gruppo PLWH e nei Controlli. Si nota che le distribuzioni differiscono tra i due gruppi, in media (fig. a destra) e in mediana (fig. a sinistra), di circa 9 e 10 anni rispettivamente: i partecipanti sani risultano più giovani dei PLWH.

Si considera ora il tempo dall'ultima dose di vaccino fino al momento delle rilevazioni della risposta immunitaria specifica: il tempo medio nei pazienti con diagnosi di infezione da HIV è approssimativamente 5 settimane (4.76 ± 3.30), considerando anche i valori più distanti dal centro della distribuzione; il 50% dei valori è compreso tra circa 2 settimane e 6 settimane (IQR~4) attorno a una mediana che supera le 3 settimane (3.64); il tempo minimo e massimo sono, rispettivamente, 1 e 19 settimane. Nel gruppo di soggetti sani, invece, la rilevazione viene effettuata, in media, dopo circa 10 settimane (9.65 ± 6.20) dall'ultima dose, ma il 50% delle osservazioni si posiziona in un intervallo di tempo compreso tra le 5 e le 10 (IQR~5) settimane dove la mediana è pari a 8.86; le rilevazioni sono effettuate a partire da un minimo di due settimane a un massimo di 27.

Dunque, il tempo trascorso dopo l'ultima somministrazione di vaccino differisce tra i due gruppi, in relazione alla mediana, di circa cinque settimane e complessivamente è minore nel campione PLWH (distanza massimo-minimo: 18 settimane) rispetto ai Controlli (25 settimane).

La figura 2 rappresenta la distanza temporale misurata in entrambi i gruppi a partire dall'ultima dose di vaccino.

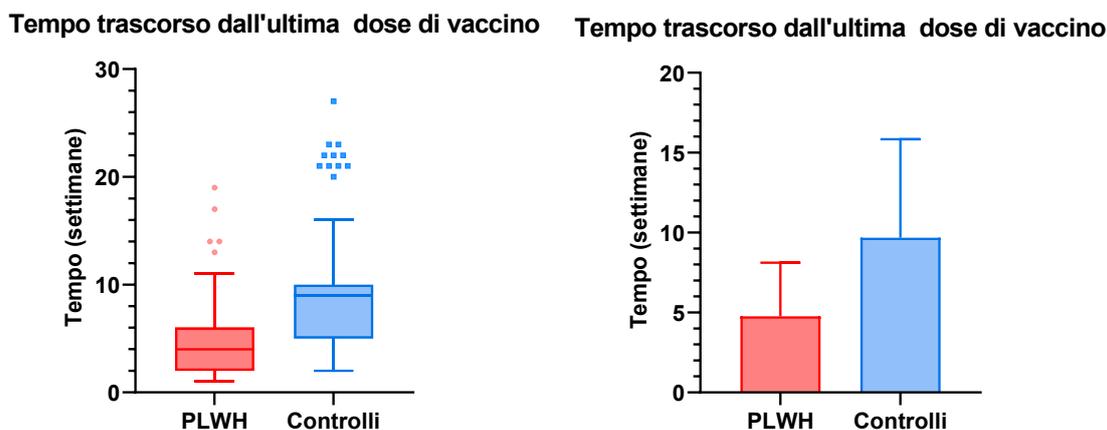


Figura 2. Box-plot e grafico a barre che mostrano il tempo trascorso dall'ultima somministrazione di vaccino. Si evidenzia una notevole differenza nei tempi, mediani (fig. a sinistra) e medi (fig. a destra) ai quali vengono effettuate le rilevazioni dopo somministrazione dell'ultima dose di vaccino: nei soggetti HIV il monitoraggio è anticipato di circa cinque settimane rispetto ai Controlli. Nel primo gruppo il range di rilevazione è di 18 settimane, nel secondo di 25. I punti e i quadrati neri indicano i valori più distanti dal centro della distribuzione (*outliers*).

Per concludere, si può affermare che la gran parte dei pazienti arruolati vengono sottoposti al prelievo post-vaccinazione a tempi diversi dalla seconda somministrazione: nel gruppo HIV tra la settimana 2 e 6, in quello di Controllo tra la quinta e la decima settimana con un periodo di tempo mediano in quest'ultimo gruppo di 5 settimane più lungo rispetto al primo.

4.1.4 Parametri di risposta al vaccino: concentrazione di IFN- γ e di anticorpi anti-S

L'analisi della risposta T-mediata, basata sulla determinazione dei livelli di IFN- γ dopo stimolazione con peptide S e condotta sui PLWH, registra una mediana pari a 3,71 con il 50% dei valori compresi tra 1,49 e 5,88 (IQR= 4,39) evidenziando una netta tendenza delle

osservazioni a concentrarsi in prossimità del valore minimo (0,00) rispetto al massimo (37,1); la media si attesta su un valore di 4,74, ricadendo esattamente nell'intervallo interquartile e confermando ulteriormente l'andamento già mostrato dalla mediana. L'inferenza sulla media (ignota) della popolazione PLWH a partire dalla media campionaria permette di individuare un intervallo di confidenza al 95% (CI) che va da 3,69 (limite inferiore) a 5,78 (limite superiore) e ipotizzare, così, l'andamento della risposta T-cellulare in tutta la popolazione PLWH da cui abbiamo estratto il campione di interesse.

L'assenza di risposta viene mostrata dal controllo negativo, dove la concentrazione mediana di IFN- γ è pari a 0,00 (IQR= [0,00-0,06]) e la media risulta $0,0578 \pm 0,150$, mentre l'avvenuta attivazione linfocitaria è attestata dal controllo positivo che evidenzia una marcata eterogeneità tra i valori rilevati: si misura un livello medio di IFN- γ di $26,0 \pm 21,4$, una mediana pari a 20,1 (IQR= [8,35-37,1]) con un massimo e un minimo che raggiungono, rispettivamente, i valori di 69,6 e 0,13. La figura 3 sintetizza graficamente quanto detto.

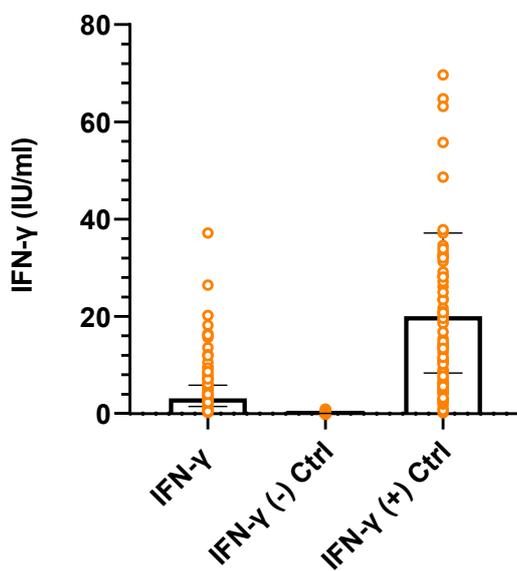


Figura 3. Concentrazioni di IFN- γ misurate nei pazienti con infezione documentata da HIV rispetto al controllo negativo e positivo. Il box e le barre nere rappresentano la mediana e l'intervallo interquartile per ogni distribuzione e permettono un rapido raffronto visivo tra la risposta cellulare al peptide S e lo standard per definire una attivazione T CD4⁺ apprezzabile o nulla.

Pertanto, la risposta cellulo-mediata all'antigene S di SARS-CoV-2 è compresa in un ampio intervallo con valore minimo indicativo di non risposta e massimo che suggerisce una forte attività T-cellulare.

Confrontando il controllo negativo con i valori di IFN- γ registrati negli individui con infezione da HIV a seguito di stimolazione con peptide S, si vuole comprendere se vi sia stata o meno una risposta significativa rispetto ai valori di riferimento negativi (risposta assente), indicativa dell'effettiva attivazione dell'immunità cellulare dopo la vaccinazione (si veda il paragrafo 4.2, dedicato alla statistica comparativa).

Esaminando allo stesso modo i valori di IFN- γ nei partecipanti sani si osserva una somiglianza rispetto alle osservazioni fatte nel gruppo PLWH: si registra una mediana di 3,23 con un IQR (1,49-5,23) e una analoga tendenza della distribuzione a ridosso dei valori minimi (min=0,0400; max=28,6). La media risultante è pari a $4,29 \pm 4,44$ ed è compresa nel range interquartile, dimostrando nuovamente un'equivalenza tra gli indici di dispersione. Infine, l'intervallo di confidenza stimato per la media della popolazione sana è incluso tra 3,25 e 5,34 suggerendo un andamento per la risposta effettrice T sovrapponibile, in media, a quello della popolazione HIV.

Il range di normalità per la risposta T CD4⁺ viene misurato sulle aliquote di controllo che registrano una mediana di 0,00 e 6,10 (IQR= [3,05-14,4]) per i controlli negativi (risposta nulla) e positivi (risposta apprezzabile), rispettivamente. Nella figura 4 vengono riportate le osservazioni appena discusse.

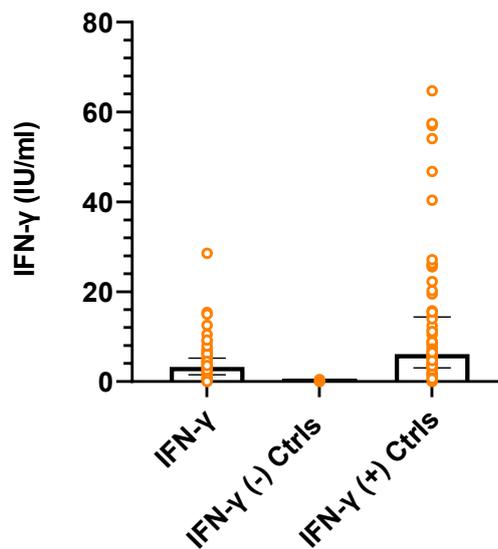


Figura 4. Concentrazioni di IFN- γ rilevate nei partecipanti sani e nei controlli, negativo e positivo, con mediane e intervallo interquartile rappresentati dal box e dalle barre di errore nere.

In base a questi dati possiamo asserire che, analogamente al gruppo PLWH, la risposta dei linfociti T, esposti al peptide veicolato dal vaccino, è misurabile e quantificabile: essa, infatti, sebbene risulti di entità ridotta rispetto agli standard di riferimento, discostandosi da essi e localizzandosi in prossimità della soglia minima di risposta, è comunque rilevante e non nulla. Quanto detto viene validato mediante test statistici nel paragrafo 4.2.

La risposta umorale viene determinata in base alla concentrazione degli anticorpi diretti contro il peptide S, espressa come \log_{10} [BAU/ml]. Il gruppo PLWH registra una concentrazione media di $2,90 \pm 0,644$ Log [BAU/ml] estremamente vicina al valore mediano (2,96) e un intervallo interquartile (IQR) che raccoglie la metà delle osservazioni compreso tra 2,68 e 3,32 Log [BAU/ml]. L'analisi descrittiva della coorte di pazienti sani mostra una risposta del tutto paragonabile a quella rilevata nel primo gruppo sia in media ($2,84 \pm 0,513$) che in mediana (2,87) e un simile distribuzione dei dati attorno agli indici di posizione (IQR [2,50-3,17] Log [BAU/ml]). I dati relativi alle concentrazioni anticorpali vengono mostrati nella figura 5.

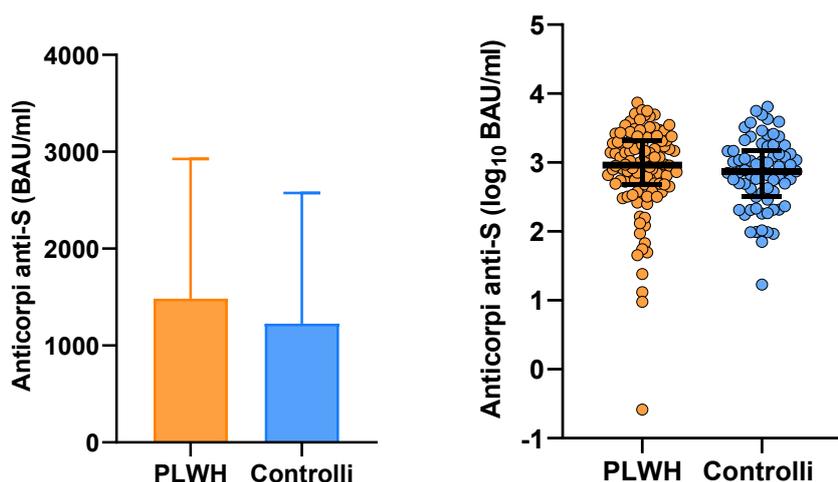


Figura 5. Concentrazione di anticorpi diretti contro il peptide S in PLWH e nei Controlli sani espressa come media \pm DS nel grafico a sinistra e come mediana e IQR (forma logaritmica, \log_{10} [BAU/ml]) in quello di destra.

Inoltre, la concentrazione minima di anticorpi calcolata non scende al di sotto di 1,23 \log_{10} [BAU/ml] diversamente dal gruppo con HIV dove il valore minimo si aggira attorno a -0,585 \log_{10} [BAU/ml] con un quarto dei valori compresi tra esso e il primo quartile. In generale non emergono dal punto di vista descrittivo forti differenze nelle concentrazioni anticorpali che esprimono la risposta umorale evocata dalla vaccinazione anti-COVID-19 nei due gruppi; tuttavia, si fa notare che nei pazienti sani esse risultano ridotte, in mediana e in media, di un fattore pari a $\sim 0,0900$ e $0,0600$ Log BAU/ml in ordine, presumibilmente legato al periodo di tempo più prolungato tra il prelievo dei campioni e l'ultima somministrazione di vaccino. Per la comparazione statistica effettuata tra le concentrazioni di anticorpi anti-S relative ai due campioni si rimanda al paragrafo 4.3.

4.1.5 Variabili specifiche del gruppo PLWH

I pazienti con diagnosi pregressa di infezione da HIV si presentano allo studio con una conta linfocitaria T CD4⁺ che si aggira, in media, intorno a 715 ± 343 cellule/mm³ (CI 95%, 650-779). Si registra un minimo di 126 e un massimo di 1843 cellule/mm³ con una mediana pari a 663 (IQR [473-909]) cellule/mm³. Solo 3 pazienti su 114 (2,6%) mostrano una conta inferiore alle 200 cellule/mm³ a dimostrazione del fatto che tutti i pazienti sono soppressi tramite terapia antiretrovirale e sono in fase di immuno-ricostituzione. In generale sia in

media che in mediana la conta risulta essere ben al di sopra di 500 cellule/mm³. Il *nadir* della conta CD4⁺ toccato in corso di malattia è di 254 ± 204 cellule/mm³ mentre la mediana risulta 198 (IQR [110-359]) cellule/mm³; il minimo registrato è di 0,1 contro un massimo di 953 cellule/mm³. Perciò, un consistente numero di pazienti ha subito un decremento compreso tra 100 e 400 cellule/mm³ circa. Il rapporto medio CD4⁺/CD8⁺ è di 1,07 ± 0,683 mentre in mediana misura 0,923 (IQR [0,632-1,35]). Per quanto riguarda il tempo trascorso dalla diagnosi di infezione al momento dell'arruolamento sono passati in media 20,0 ± 10,0 anni che corrispondono esattamente alla mediana (IQR [3,00 – 29,0]). La diagnosi più recente risale a 3 anni fa mentre quella più datata a 36 anni fa. Dunque, lo studio comprende pazienti con diagnosi di HIV per gran parte di lunga data, conta T CD4⁺ in ripresa e stabili dal punto di vista della replicazione virale, grazie al regime farmacologico cui sono sottoposti, che consente un ripristino progressivo della conta a partire dai minimi raggiunti.

4.2 Risposta T- cellulare valutata in base alla secrezione di IFN- γ

I risultati ottenuti nel gruppo PLWH danno prova di una differenza significativa tra la risposta T-mediata al vaccino (peptide S) e l'assenza di una risposta efficace (controllo negativo) (t- test e test di Wilcoxon per ranghi, $p < 0,0001$), permettendo di concludere che il paziente con HIV sotto regime cART sviluppa sicuramente una risposta non nulla.

Sebbene l'analisi della curva di distribuzione dei dati relativi all'IFN- γ evidenzia una prevalente concentrazione a ridosso dell'intervallo 0-6 IU/ml, l'attivazione linfocitaria indotta dal contatto delle cellule con un antigene analogo alla proteina S di SARS-CoV-2 si dimostra significativamente al di sopra rispetto al baseline fornito dal controllo negativo come si apprezza nel grafico in figura 6.

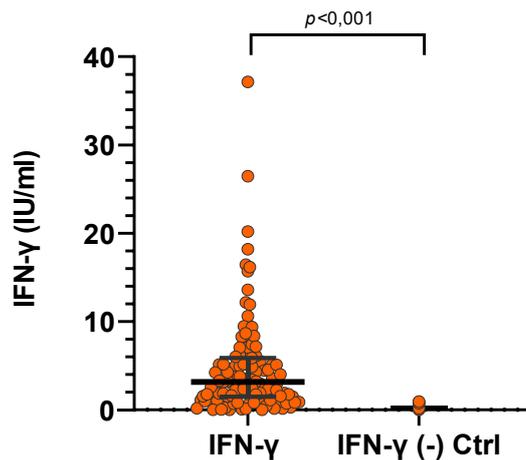


Figura 6. Entità della risposta T-cellulare rilevata in PLWH rispetto ad una risposta nulla (controllo negativo). La differenza è significativa ($p=0,001$). La barra orizzontale indica la mediana mentre le barre d'errore delimitano l'intervallo interquartile.

Nel gruppo di Controllo i valori di IFN- γ osservati registrano una mediana (3,23 IU/ml) che, oltre ad essere circa la metà della corrispettiva calcolata nel controllo positivo (6,10 IU/ml), corrisponde pressappoco al primo quartile (3,05 IU/ml) dell'intervallo che definisce lo spettro di riferimento per l'attività T-cellulare, perciò, si è già in grado di apprezzare come la risposta linfocitaria alla stimolazione con peptide S, anche nei partecipanti sani, sia tendenzialmente spostata in misura maggiore verso i valori inferiori di intervallo. Analoghe considerazioni sono valide per la media (4,29 IU/ml) che risulta circa 3 volte inferiore in relazione al gruppo di controllo positivo (12,8 IU/ml).

Tuttavia, ciò non deve essere in alcun modo interpretato come una scarsa reazione delle cellule dell'immunità specifica al vaccino. In effetti, paragonando i livelli di IFN- γ rilevati su campione di sangue con le aliquote di controllo negativo, si ottiene come risultato una differenza statisticamente significativa ($p < 0,0001$) che dimostra l'avvenuta reazione nei confronti del peptide S introdotto tramite vaccinazione (figura 7).

Da queste osservazioni si apprende che la risposta cellulo-mediata indotta dal vaccino anti-COVID-19 viene indiscutibilmente stimolata anche nella coorte di pazienti sani.

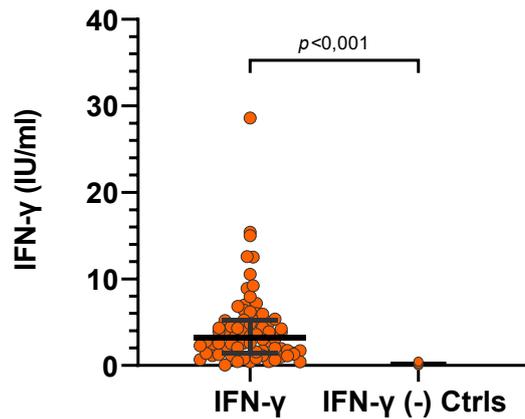


Figura 7. Ampiezza della risposta T-mediata al peptide S nei pazienti sani a confronto con un controllo negativo. Si evidenzia una differenza significativa ($p < 0,001$) indicativa di avvenuta attivazione delle cellule T dopo vaccinazione. La mediana corrisponde alla linea spessa orizzontale mentre le barre d'errore definiscono l'intervallo tra il primo e il terzo quartile.

Alla luce delle evidenze emerse nei singoli campioni, PLWH e Controlli, si può concludere che l'immunità T-cellulare è ugualmente sollecitata dall'esposizione al peptide S e sviluppa una risposta apprezzabile molto simile nei due gruppi. In altre parole, il raggiungimento di una risposta cellulare misurabile non è influenzato dall'infezione da HIV controllata farmacologicamente, come dimostrano anche le relative frequenze di risposta rispetto al gruppo di controllo (PLWH: 95,5% [105/111], Controlli: 100% [72/72]; test Chi-quadro, $p=0,173$)

Mettendo, poi, a confronto le concentrazioni citochiniche misurate nelle due coorti di pazienti si ottiene una estrema concordanza ovvero una differenza non significativa tra i dati (U-test di Mann-Whitney, $p=0,973$) che dimostrano indubbiamente un'attivazione delle cellule T dopo vaccinazione quasi identica per quanto riguarda l'ampiezza e il comportamento rispetto al baseline (non risposta). L'immediata conclusione che si può trarre dai risultati sopra discussi è che nel PLWH la vaccinazione evoca una risposta T completamente equiparabile per entità a quella prodotta nei partecipanti sani. I risultati esposti possono essere visualizzati nelle figure 8-9.

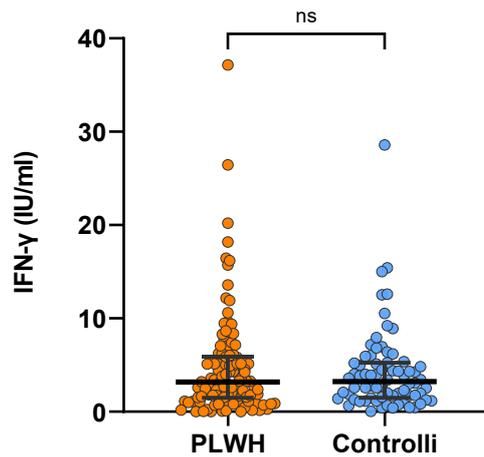


Figura 8. Il grafico a dispersione mostra il confronto statistico tra le concentrazioni di IFN- γ misurate negli individui con diagnosi pregressa di HIV e in quelli sani: non si evidenzia una differenza statisticamente significativa (Mann-Whitney, $p=0,973$). Le barre nere indicano la mediana, il primo e il terzo quartile della distribuzione.

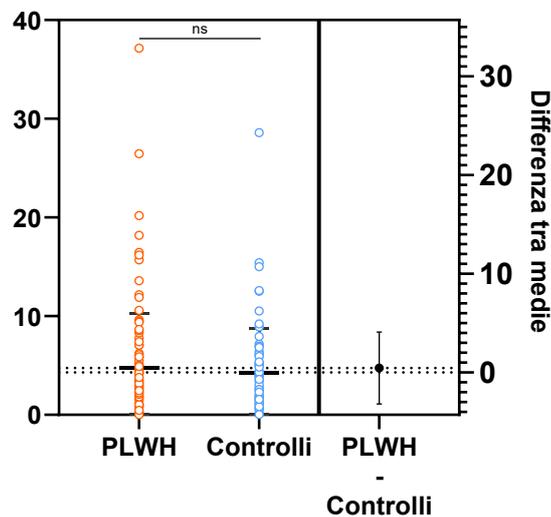


Figura 9. Grafico a punti che mette a confronto i livelli medi di IFN- γ relativi al gruppo PLWH con quelli dei pazienti sani (Controlli). A destra si può osservare la differenza tra medie, compresa nel rispettivo CI 95% (intervallo di confidenza al 95%), ottenuta dal t-test a due code per campioni indipendenti. Le linee nere orizzontali rappresentano le medie \pm DS, quella verticale individua l'intervallo di confidenza per la differenza tra medie. Non emerge una differenza significativa tra i due gruppi in relazione alle concentrazioni di citochina effettrice (t-test a due code con correzione di Welch, $p=0,552$)

4.3 Risposta umorale basata sulle concentrazioni di anticorpi circolanti anti-S

La risposta umorale valutata per mezzo della concentrazione di anticorpi diretti contro il peptide S si presenta in maniera analoga nei due campioni studiati, come è possibile desumere dall'analisi descrittiva compiuta nel paragrafo 4.1.4. La produzione anticorpale raggiunge livelli massimi simili con una lieve differenza di $\sim 0,0600 \log_{10}$ [BAU/ml] tra i PLWH (3,87) e i Controlli (3,81) mentre il minimo registrato nei primi è pari a $-0,0585$ contro $1,23 \log_{10}$ [BAU/ml] dei pazienti sani; quindi, una frazione dei PLWH pari al 25% evidenzia una risposta umorale poco consistente rispetto alla restante parte che, invece, va incontro a una produzione di anticorpi anti-S in linea con quella dei soggetti non HIV-infetti. Il confronto tra medie e mediane non fa emergere una significativa differenza nell'entità della risposta umorale successiva alla vaccinazione ($p=0,471$ per la media; $p=0,154$ per la mediana) a dispetto delle differenze logaritmiche in mediana e in media esistenti tra le due classi; tali evidenze sono illustrate nei grafici sottostanti (figura 10).

Pertanto, in accordo con le evidenze ottenute in merito alla risposta T-mediata alla vaccinazione (si veda paragrafo 4.2), i risultati documentano una reazione anticorpale indotta dal vaccino, nel PLWH, del tutto sovrapponibile in ampiezza rispetto al controllo sano.

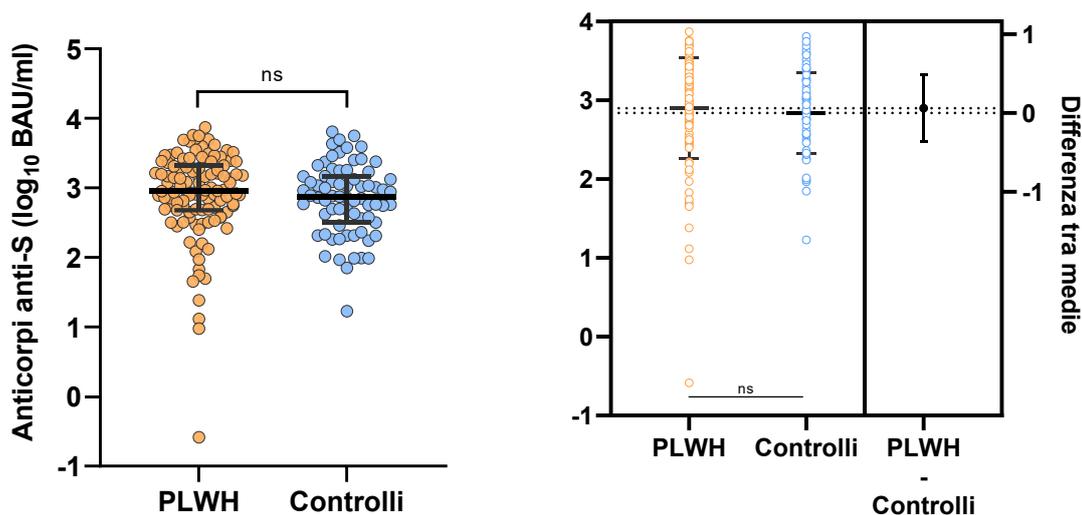


Figura 10. Grafici a punti che mettono a confronto le concentrazioni di anticorpi anti-S tra le due coorti di pazienti. In entrambi è apprezzabile una forte analogia nell'ampiezza della risposta umorale sviluppata nei due gruppi, con differenze non significative (Mann-Whitney, $p=0,154$; t-test a due code, $p=0,471$). La differenza tra medie risultante dal t-test a due code è riportata nella sezione destra del grafico in basso. Nel grafico in alto le barre nere orizzontali indicano la mediana e i limiti inferiore e superiore dell'IQR. Nel grafico in basso con le linee continue si individuano le medie \pm DS mentre la barra verticale rappresenta il CI 95% della differenza tra le medie.

4.4 Andamento delle risposte T-cellulare e anticorpale rispetto al tempo trascorso dall'ultima dose di vaccino

Questo paragrafo è incentrato sullo studio di correlazione tra le variabili legate alla risposta cellulare e umorale contro il vaccino anti-COVID-19 (IFN- γ e Anticorpi anti-S) e il tempo trascorso a partire dall'ultima somministrazione; quindi, si descrive la relazione secondo cui esse si modificano al variare del tempo, in particolare come esse si comportano all'aumentare di tale fattore. Si presentano prima i risultati ricavati nel gruppo PLWH e, per confronto, quelli relativi ai Controlli in considerazione delle affinità riscontrate nelle modalità di risposta immunitaria specifica nell'ambito di entrambi i gruppi.

Iniziando dal primo campione, la maggior densità di frequenza della variabile "IFN- γ " si osserva nella finestra temporale compresa tra le 2 e le 8 settimane successive all'ultima dose di vaccino, dove si registra un massimo di 37,1 UI/ml a 2 settimane mentre l'intervallo dalla prima alla quinta settimana fa osservare i valori più elevati.

Il grafico a dispersione mostrato in figura 11 illustra l'andamento della concentrazione citochinica al variare del tempo - dall'ultima dose di vaccino - al quale vengono effettuate le rilevazioni: i valori non solo si distribuiscono con alta frequenza entro un intervallo temporale ben preciso (si veda sopra) ma tendono a decrescere all'aumentare del tempo, indicando la presenza di una correlazione inversa o negativa tra le variabili studiate. Questa evidenza viene confermata dal test di correlazione per ranghi di Spearman che restituisce un valore del coefficiente di correlazione minore di zero ($\rho = -0,222$) e suggerisce con forza che le concentrazioni di IFN- γ sono negativamente correlate al tempo in maniera statisticamente significativa ($p=0,0205$).

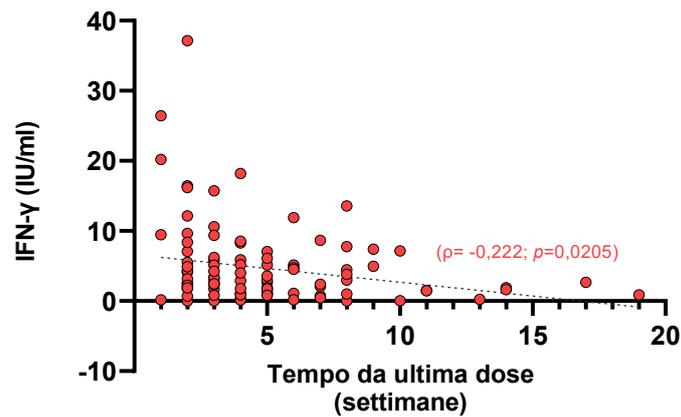


Figura 11. Grafico a dispersione della concentrazione di IFN- γ , a seguito di stimolazione con peptide S, in relazione al tempo trascorso dall'ultima dose di vaccino in PLWH. Viene mostrata, a titolo di paragone, anche la teorica relazione di dipendenza lineare tra le due variabili mediante la retta di regressione più adatta, che, tuttavia, si associa ad un $R^2 \sim 0$ ($R^2 = 0.100$) (il modello lineare non è adatto a esprimere la relazione tra i dati). Le concentrazioni di IFN- γ presentano una correlazione inversa significativa con il tempo successivo all'ultima somministrazione di vaccino (coefficiente di Spearman $\rho = -0,222$; $p = 0,0205$).

Valutando i livelli di anticorpi anti-S, sempre nei pazienti con infezione da HIV si nota una distribuzione di frequenza simile a quella vista per le concentrazioni di IFN- γ con la maggior parte dei valori localizzata in un periodo di tempo che va dalle 2 alle 8 settimane dall'ultima dose di vaccino, dove si misurano i livelli più alti, compreso il massimo uguale a $4,29 \log_{10}$ [BAU/ml], raggiunto nella settima settimana. L'andamento che si osserva nel grafico in figura 12 suggerisce che gli anticorpi anti-S si riducono in concentrazione al crescere del tempo trascorso dopo l'ultima dose di vaccino secondo un modello di correlazione negativa; in accordo con ciò, il test di correlazione non parametrico di Spearman calcola un indice $\rho = -0,319$ e conferma una relazione di interdipendenza inversa (correlazione negativa) significativa per cui le concentrazioni di anticorpi anti-S mostrano valori più bassi in corrispondenza di finestre temporali estese, che superano ad esempio, le 8 settimane ($p = 0,0006$).

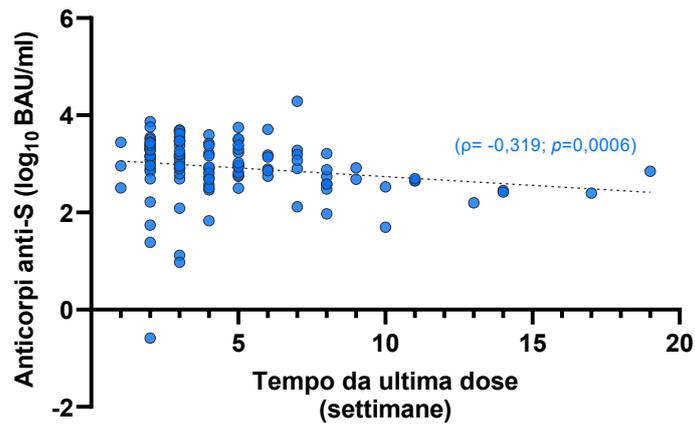


Figura 12. Relazione tra concentrazione di anticorpi anti-S, dopo somministrazione di vaccino anti-SARS-CoV-2, e tempo successivo a vaccinazione (ultima dose) nei soggetti affetti da infezione da HIV (PLWH). Si riporta, a titolo di paragone, la retta di regressione lineare, non appropriata a descrivere la relazione tra i dati in quanto l'indice di determinazione R^2 è circa uguale a zero. Gli anticorpi variano in maniera inversamente correlata rispetto al tempo trascorso dopo ultima dose di vaccino (coefficiente di Spearman $\rho = -0,319$; $p = 0,0006$).

Tutti i risultati ottenuti provano che sia la concentrazione di IFN- γ , in risposta all'esposizione al peptide S, che quella di anticorpi anti-S dopo vaccinazione tendono a modificarsi con andamento decrescente al progredire del tempo a partire dall'ultima somministrazione di vaccino.

Il grafico della figura 13 riassume visivamente l'andamento simultaneo di entrambe le variabili in relazione al tempo.

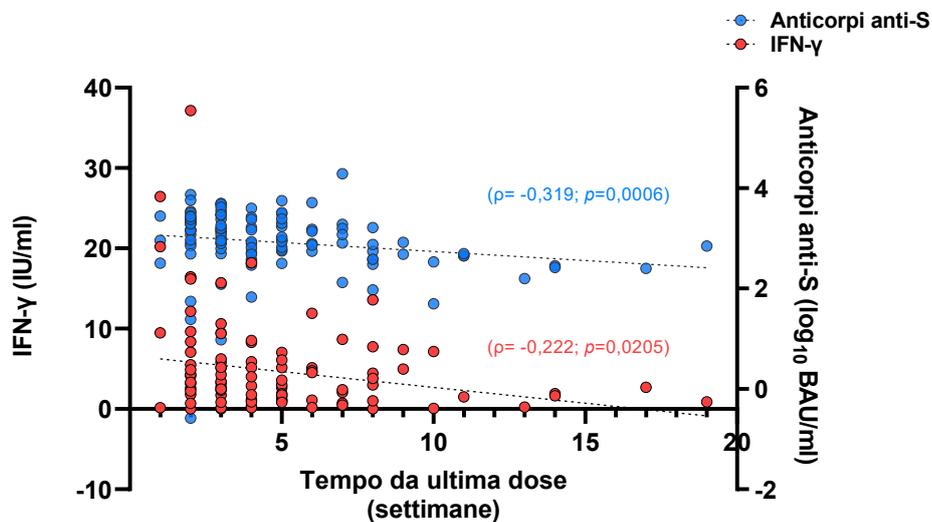
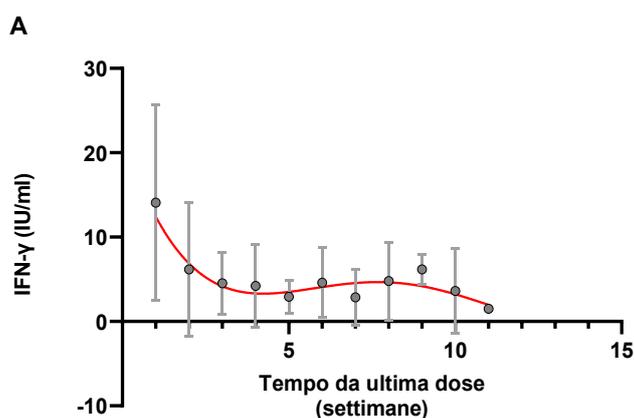


Figura 13. Grafico conclusivo che rappresenta la correlazione tra le concentrazioni di IFN- γ (prodotto a seguito di stimolazione con peptide S) e di anticorpi anti-S rispetto al tempo trascorso dall'ultima dose di vaccino. Entrambe le variabili esibiscono una tendenza diretta verso un decremento in relazione ad un aumento del tempo al quale esse vengono misurate. Le correlazioni si considerano significative ($p=0,0205$; $p=0,0006$, rispettivamente).

L'andamento in media delle concentrazioni di interferone e di anticorpi anti-S all'interno di una finestra temporale di 11 settimane dopo l'ultima dose di vaccinazione standard è rappresentato nei grafici in figura 14, dove vengono tracciate le curve di "lisciamento" polinomiali che mostrano approssimativamente la variazione complessiva nel tempo delle due risposte. Come già suggerito dalle correlazioni trovate in precedenza, le concentrazioni di IFN- γ , in media, raggiungono i valori più alti dopo la prima settimana dal termine della vaccinazione standard, successivamente si mantengono all'incirca su un plateau tra la seconda e l'ottava settimana e iniziano a subire un decremento dalla nona settimana in poi; i livelli di anticorpi anti-S, invece, tendono ad assumere valori elevati già dalla prima settimana, mantenendosi pressoché costanti fino all'ottava, in corrispondenza della quale vanno incontro ad una graduale discesa.



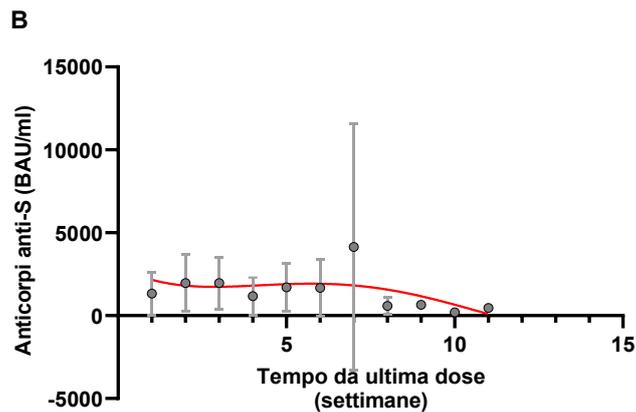


Figura 14. I grafici danno un'idea dello sviluppo, in media, delle risposte cellulo-mediata (A) e umorale (B) al vaccino in PLWH entro un intervallo di tempo dopo l'ultima dose di undici settimane. Le curve polinomiali di quarto ordine mostrano come l'interferone, partendo dai valori più alti in prima settimana scema gradualmente nel tempo, mentre gli anticorpi anti-S, attestandosi dapprima sui valori elevati fino all'ottava settimana, superata questa vedono un progressivo ribasso.

I risultati illustrati depongono a favore di un ruolo determinante del tempo che decorre dopo l'ultima dose di vaccino nell'influenzare l'andamento dei livelli sia di IFN- γ che di anticorpi anti-peptide S.

L'evidenza più rilevante è che le risposte valutate mostrano la tendenza a decrescere man mano che aumenta il tempo dalla conclusione del ciclo di vaccinazione standard e si può dimostrare il ruolo predittivo di questa variabile temporale attraverso un modello di regressione lineare semplice.

Il tempo trascorso dall'ultima dose presenta un'associazione significativa con le risposte cellulare ($p=0,026$) e umorale ($p < 0,000$) al vaccino, nel senso che è in grado di predire un abbassamento progressivo dell'entità delle risposte a valori sotto-mediani all'aumentare di due unità di tempo (settimane) ($\beta=-0,0151$, OR=0,740; $\beta=-0,336$, OR=0,511, rispettivamente per la risposta cellulare e umorale). I risultati dettagliati sono riportati nella tabella 4 e vengono ripetuti al termine di questo paragrafo per agevolare la comprensione del potere predittivo del tempo dall'ultima dose nei confronti delle variazioni nelle dimensioni della risposta adattativa a SARS-CoV-2.

| Variabili temporali | Regressione logistica semplice | | | | | |
|----------------------------------|--------------------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|----------------|
| | IFN- γ | | | Anticorpi anti-S | | |
| | OR | CI (95%) | <i>p</i> value | OR | CI (95%) | <i>p</i> value |
| Tempo da ultima dose (settimane) | 0,7400 | (0,5678; 0,9645) | 0,026 | 0,5112 | (0,3557; 0,7347) | < 0,000 |

Tabella 4. Si riassumono i risultati della regressione logistica semplice basata sul tempo trascorso dall'ultima dose di vaccino ed applicata alle concentrazioni di interferone γ e anticorpi anti-Spike. L'effetto della variabile temporale è rilevante nel predire come la risposta cellulare e umorale si riduca quantitativamente ad ogni incremento di due settimane di tempo ($p=0,026$, $p < 0,000$ rispettivamente; ORs < 0).

Nel campione costituito da individui sani, le concentrazioni di IFN- γ si distribuiscono con maggior frequenza lungo un periodo che si estende tra le 2 e le 10 settimane dopo inoculazione dell'ultima dose di vaccino, dove fanno registrare anche i valori più alti della distribuzione e un massimo (28,6 IU/ml) alla quarta settimana; analogamente al campione PLWH, l'andamento della citochina esprime una correlazione negativa con il tempo ($\rho=-0,460$), riducendosi all'aumentare della distanza dall'ultima dose, come si apprende dal test di Spearman, che calcola un *p*-value notevolmente inferiore al livello di significatività (α) fissato a 0,05 ($p<0,0001$). Il risultato è mostrato graficamente in figura 15.

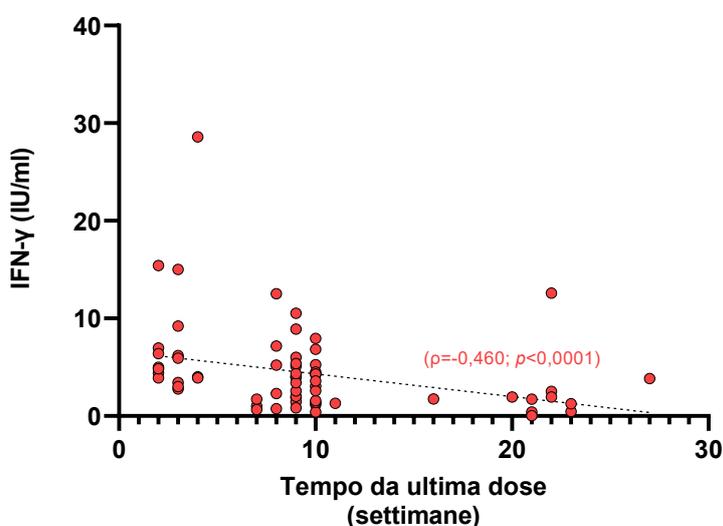


Figura 15. Il grafico esplora la relazione tra le concentrazioni di IFN- γ e il tempo trascorso dall'ultima dose di vaccino nei Controlli. I livelli di citochina variano nel tempo secondo una

correlazione inversa significativa ($\rho=-0,460$; $p<0,0001$). La retta tratteggiata esprime il teorico rapporto di dipendenza lineare tra i dati, in questo caso inappropriato ($R^2=0,103\sim 0$).

Per quanto riguarda le concentrazioni di anticorpi anti-S, si osserva una distribuzione bimodale con maggior densità di frequenza tra la seconda e la decima settimana, dove vengono raggiunti valori più elevati, incluso il massimo ($3,81 \log_{10}$ [BAU/ml]) e una minoranza di osservazioni concentrata in un intervallo di tempo esteso dalla settimana 20 alla settimana 23 in cui i livelli di anticorpi registrano valori più bassi.

Si evidenzia, pertanto, una relazione di interdipendenza significativa ($\rho=-0,634$; $p<0,0001$) tra la concentrazione anticorpale e il tempo trascorso dopo l'ultima inoculazione di vaccino, quindi, la risposta umorale, analogamente a quella cellulo-mediata, varia in funzione del tempo nei Controlli.

Questo andamento decrescente nel tempo viene riportato nel grafico in figura 16.

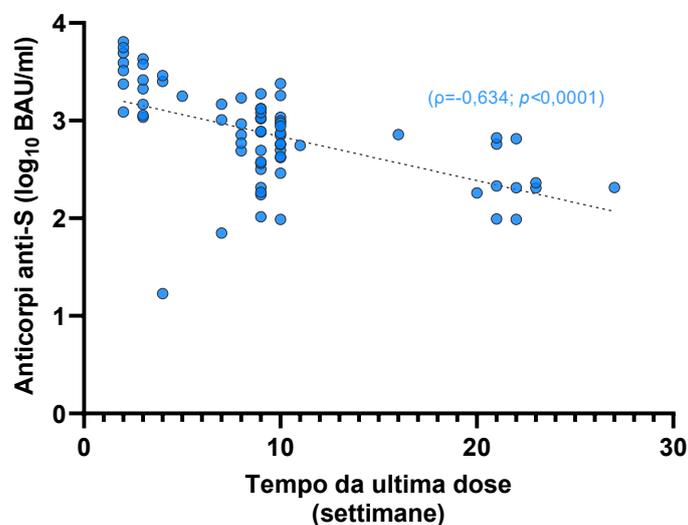


Figura 16. Grafico a dispersione della concentrazione di anticorpi anti-S rispetto al tempo successivo all'ultima dose di vaccino nei pazienti sani. La distribuzione dei valori di anticorpi sembra essere bimodale mostrando fin dall'inizio una correlazione significativa con il tempo in senso decrescente ($\rho=-0,634$; $p<0,0001$). Perciò, la concentrazione di anticorpi subisce un decremento con il progredire del tempo. Un modello di dipendenza lineare per esprimere tale andamento risulta inadeguato (indice di determinazione $R^2\sim 0$).

Il comportamento delle variabili legate alla risposta specifica al vaccino in funzione del tempo nel gruppo dei Controlli si può apprezzare nel grafico in figura 17. I risultati

dimostrano che la risposta cellulo-mediata e umorale nel gruppo di pazienti sani è strettamente legata al fattore “tempo”, divenendo più debole, da un punto di vista quantitativo, con l’aumento dell’intervallo di tempo dall’ultima dose di vaccino.

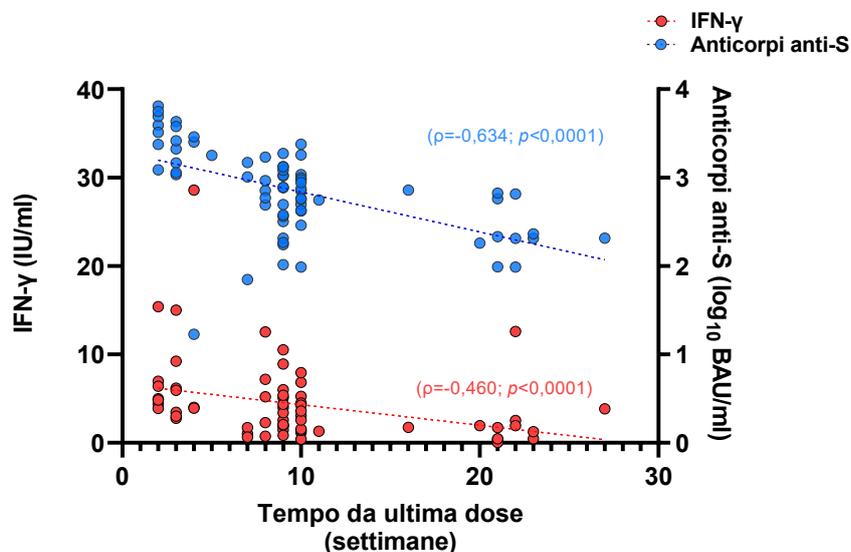


Figura 17. Il grafico integra i risultati delle figure 15-16 mostrando l’andamento delle concentrazioni di IFN- γ e di anticorpi anti-S in relazione al tempo intercorso tra la somministrazione dell’ultima dose di vaccino e le misurazioni nel gruppo di controllo. Si osservano correlazioni significative tra le concentrazioni e il tempo ($p < 0,0001$) e non esiste un rapporto di dipendenza lineare tra loro ($R^2 \sim 0$). I risultati ammettono la possibilità di predire un’evoluzione temporale delle suddette risposte senza valutare regolarmente i livelli di IFN- γ e di anticorpi plasmatici anti-Spike.

Il decorso, in media, della risposta specifica evocata dal vaccino lungo un intervallo di tempo pari a 23 settimane viene esemplificato dalle curve di “lisciamento” polinomiali di quarto grado per l’IFN- γ e gli anticorpi anti-S.

In linea con le correlazioni riscontrate, le concentrazioni medie di citochina aumentano lentamente nelle prime settimane fino a toccare un massimo alla quarta settimana dall’ultima dose, poi iniziano a ridursi gradualmente nelle settimane successive.

Gli anticorpi anti-Spike mostrano, invece, un ripido decremento; si registra, infatti, un massimo ad una settimana dal termine della vaccinazione, seguito da una brusca discesa tra la seconda e la quinta settimana fino a raggiungere valori più bassi, intorno ai quali le concentrazioni anticorpali si mantengono costanti nelle settimane seguenti.

La figura 18 riporta graficamente questi risultati.

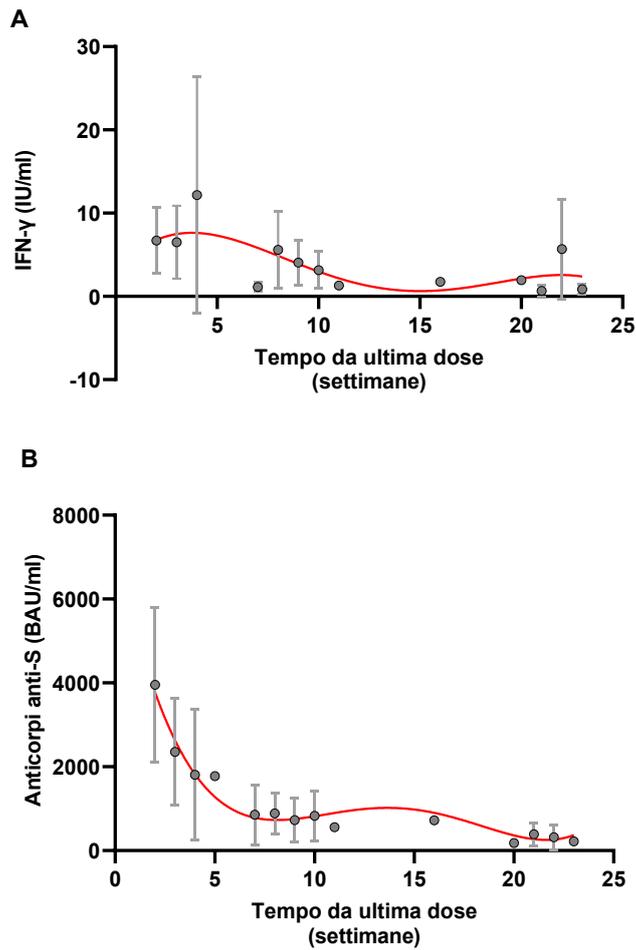


Figura 18. Variazione in media delle concentrazioni di IFN- γ (A) e di anticorpi anti-S (B) rispetto al tempo nei Controlli, valutata in una finestra di 23 settimane post-vaccinazione e rappresentata approssimativamente dalle rispettive curve polinomiali di quarto ordine. Si osserva per entrambe le risposte, cellulare e umorale, un simile andamento in discesa, più morbido nella prima e più ripido nella seconda.

Riassumendo, l'analisi condotta sui due campioni PLWH e Controlli suggerisce delle analogie rilevanti nel comportamento della risposta cellulare e umorale a seguito di vaccinazione anti-COVID-19: i pazienti con diagnosi documentata da HIV presentano concentrazioni di IFN- γ e anticorpi anti-S che si modificano all'avanzare del tempo, subendo un decremento all'aumentare della distanza temporale dall'ultima dose di vaccino, esattamente come si osserva nel gruppo di controllo; infatti in entrambi i gruppi le risposte

cellulare e umorale sono sostenute, rispettivamente, fino alla ottava e settima settimana, a ridosso della quale tendono a sovrapporsi e mantenersi a ridosso dei livelli minimi, come mostra la figura 19.

Inoltre, confrontando nei due gruppi le concentrazioni medie dei marcatori della risposta immune S-specifica rispetto al tempo post-vaccino, si osserva una diminuzione media percentuale dei valori di interferone pari al 17% nei Controlli contro il 22% dei PLWH (settimana 1 e 8), mentre si calcola una diminuzione dei livelli anticorpali pari al 78% nei primi rispetto al 70% dei secondi (settimana 1-7).

Ne consegue che, in entrambi i gruppi, gli anticorpi vanno incontro ad un decremento più pronunciato, in un periodo di 6 settimane, rispetto alle concentrazioni di citochina effettrice che subiscono, invece, un calo molto moderato durante le 7 settimane successive a vaccinazione.

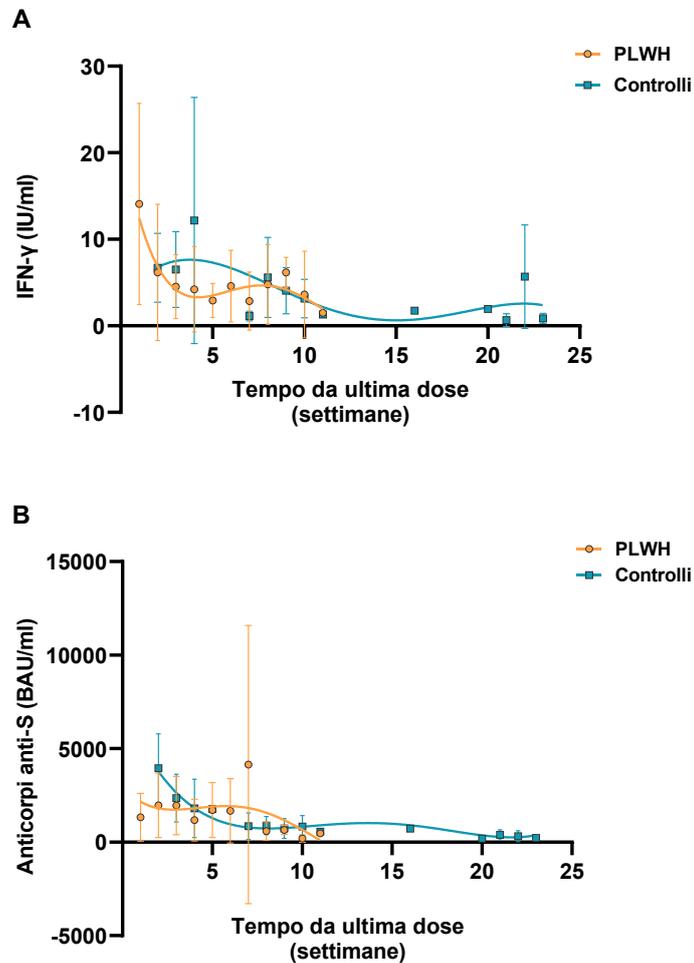


Figura 19. Evoluzione temporale delle concentrazioni medie di IFN- γ (A) e dei titoli di anticorpi Spike-specifici (B) nel gruppo PLWH e nei Controlli. La risposta adattativa alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2 risulta marcata, in entrambi i gruppi, durante il primo mese, mentre diminuisce nelle 4 settimane successive (settimana-ottava settimana dopo ultima dose), mostrando un andamento decrescente uniforme per tutto il periodo di rilevazione.

Nonostante l'intervallo temporale di misurazione sia più prolungato nei Controlli rispetto ai PLWH, le curve di risposta nei due gruppi si incontrano, sovrapponendosi, dopo le undici settimane dall'ultima dose.

Si notano, però, delle differenze nei PLWH rispetto ai sani relative all'ampiezza media della risposta T-mediata e anticorpale nella finestra di tempo compresa tra la prima e la settimana od ottava settimana: i livelli medi di citochina T-effettrice registrano un picco alla settimana 1 dopo il quale si riducono e si mantengono stabili fino alla settimana 8 mentre nei Controlli mostrano un andamento parabolico, toccando il massimo alla quarta settimana per poi scendere lentamente a partire dalla ottava; i titoli medi di anticorpi anti-S nei pazienti con HIV risultano stabili per tutto l'arco temporale considerato, ma al di sotto di quelli misurati nei Controlli dove, a partire da un picco in seconda settimana, inizia un lento e graduale declino con netta diminuzione dopo la settima settimana.

A fronte di questa variabilità delle concentrazioni medie di IFN- γ e di anticorpi anti-Spike nel periodo delle prime 7-8 settimane dall'ultima dose di vaccinazione standard, è indispensabile ricordare che, comunque, la risposta adattativa vaccino-indotta nei PLWH, considerata nel complesso, risulta sovrapponibile in termini di dimensioni (o intensità) (si veda il paragrafo 4.2-3) rispetto agli individui sani e mostra anche un'identica persistenza, limitatamente allo specifico intervallo di tempo di rilevazione.

I risultati ottenuti dalla regressione logistica univariata relativa alla risposta specifica al vaccino nei soggetti HIV indicano una notevole associazione tra la sua entità e il tempo dall'ultima dose.

La tabella 5 riporta l'OR e il rispettivo *p*-value per ciascuna variabile di risposta in funzione del tempo (gli esiti sono definiti in base alle concentrazioni raggiunte dagli indicatori di attivazione T e B-cellulare rispetto ai valori mediani: risposta ridotta se inferiore alla mediana, marcata se superiore).

Secondo quanto emerso dall'analisi, il tempo successivo all'ultima dose di vaccinazione standard incide significativamente sulle concentrazioni di IFN- γ ($p=0,0260$) e di anticorpi ($p<0,000$), riducendo la probabilità di misurare livelli compatibili con una risposta consistente ad ogni incremento di due settimane ($\beta=-0,151$, OR=0,740 per l'interferone; $\beta=-0,336$, OR=0,511 per gli anticorpi anti-S). In altre parole, la variabile temporale riveste un ruolo rilevante nella previsione di un *outcome* di risposta progressivamente meno forte ogni due settimane che decorrono dopo somministrazione dell'ultima dose di vaccino.

| Variabili temporali | Regressione logistica semplice | | | | | |
|----------------------------------|--------------------------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|
| | IFN- γ | | | Anticorpi anti-S | | |
| | OR | CI (95%) | <i>p</i> value | OR | CI (95%) | <i>p</i> value |
| Tempo da ultima dose (settimane) | 0,740 | (0,568; 0,965) | 0,0260* | 0,511 | (0,356; 0,735) | <0,000* |

Tabella 5. Risultati della regressione logistica univariata applicata alla risposta cellulo-mediata e umorale al vaccino anti-COVID-19 nel gruppo HIV. Il tempo trascorso dall'ultima dose di vaccino è un fattore predittivo significativo dello sviluppo e del mantenimento di una valida reazione immune specifica nel tempo: ad ogni incremento di due settimane è attesa una riduzione dell'entità di risposta T- e B-mediata a livelli sotto-mediani.

4.5 Interazione tra risposta cellulo-mediata e umorale al vaccino anti-SARS-CoV-2

Si descrivono in questo paragrafo i risultati dell'analisi di correlazione (univariata) tra le due variabili della risposta immunitaria adattativa alla vaccinazione, IFN- γ e anticorpi circolanti anti-S, nei due campioni PLWH e sani. I grafici delle figure 20 e 21 sono rappresentativi delle relazioni osservate.

Per quanto riguarda gli individui con infezione pregressa da HIV, le concentrazioni di IFN- γ misurate esibiscono una tendenza alla crescita in relazione ad un aumento di quelle anticorpali, suggerendo l'esistenza di una correlazione positiva o crescente ($\rho=0,493$): l'entità della risposta T e anticorpale dopo vaccinazione si influenzano a vicenda e in maniera significativa ($p<0,0001$) (figura 20).

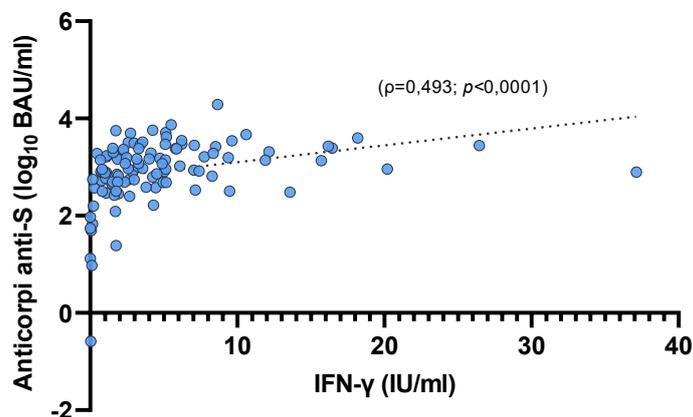


Figura 20. Correlazione esistente tra le concentrazioni di IFN- γ e di anticorpi anti-S in PLWH. La crescita dell'una si accompagna all'incremento dell'altra secondo una relazione di interdipendenza positiva ($\rho= 0,493$) che risulta statisticamente significativa ($p<0,0001$).

Analoghe considerazioni valgono per il gruppo di individui sani dove le concentrazioni di IFN- γ salgono in rapporto ad un aumento degli anticorpi circolanti anti-S; anche in questo caso emerge una correlazione positiva ($\rho= 0,401$, figura 21) e si è portati a concludere che le due risposte cellulare e umorale al vaccino, anche nei Controlli dipendono in maniera significativa l'una dall'altra ($p<0,0006$).

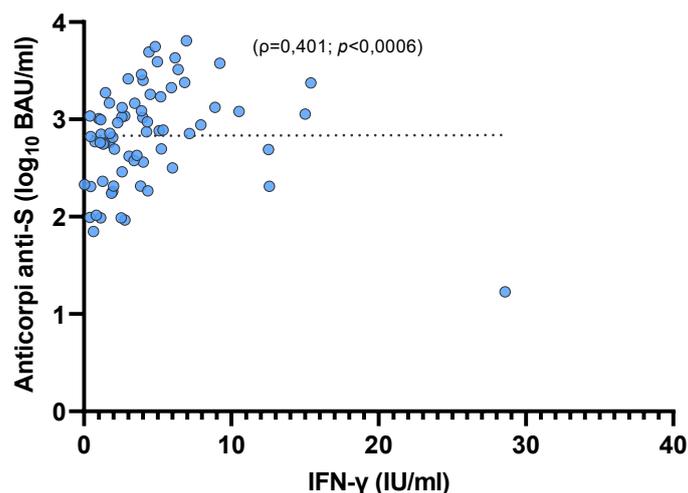


Figura 21. Grafico a dispersione che esplora la relazione che intercorre tra le concentrazioni di IFN- γ e di anticorpi plasmatici anti-Spike nei Controlli. I risultati depongono a favore di una correlazione positiva ($\rho=0,401$) secondo cui l'aumento di una variabile si associa in maniera significativa all'incremento dell'altra ($p<0,0006$).

Da questa analisi si evince che le risposte cellulare e umorale sviluppate nei confronti del vaccino anti-COVID-19 sono correlate in maniera crescente sia nel campione PLWH che quello dei Controlli.

Per riassumere, le evidenze trovate mostrano che le risposte, sia in PLWH che nei sani, oltre che essere quantitativamente comparabili, presentano una stretta associazione citochina-anticorpi e un quasi identico decorso temporale, caratterizzato da un decremento nei livelli di IFN- γ e anticorpi anti-S.

Nel caso particolare del gruppo PLWH i risultati della regressione logistica univariata per quanto riguarda l'effetto delle concentrazioni di IFN- γ sulla produzione anticorpale mettono in evidenza che la risposta T-mediata è un fattore significativo ($p=0,0430$) nel prevedere i livelli di anticorpi raggiunti: ad ogni incremento di 1,00 IU/ml di citochina aumenta la probabilità di rilevare una concentrazione di anticorpi sopra alla mediana (907 BAU/ml, soglia arbitraria per distinguere due esiti di risposta, scarsa (0) o robusta (1)) con un OR=1,10 ($\beta=0,0921$).

Analoghi risultati si ottengono considerando l'effetto dei titoli anticorpali sull'entità della risposta T-cellulare: la regressione logistica sottolinea che le concentrazioni di Ig anti-S ne rappresentano un fattore predittivo significativo, poiché ogni aumento di 500 BAU/ml

produce un aumento della probabilità di rilevare una marcata reazione cellulare ($p=0,003$; $\beta=5,34 \times 10^{-4}$; OR=1,306).

Quanto emerso avvalorava ulteriormente la correlazione che sembra regolare l'intensità delle risposte T e B-cellulare al peptide S del vaccino anti-COVID-19.

Modelli di regressione multivariata, che includono la citochina effettrice o le Ig anti-S insieme al tempo dall'ultima dose, mostrano che queste variabili sono fattori predittivi indipendenti di *outcome*, ovvero validi, se presi singolarmente.

I risultati completi della regressione multivariata vengono raccolti nella tabella 6.

| Regressione logistica semplice e multipla | | | |
|--|------------------|----------------|----------------|
| Variabili | Anticorpi anti-S | | |
| | OR | CI (95%) | <i>p</i> value |
| IFN- γ (peptide S) [IU/ml] | 1,10 | (1,00; 1,20) | 0,043* |
| Tempo da ultima dose (settimane) + IFN- γ (IU/ml) | 0,552 | (0,385; 0,792) | 0,001* |
| | 1,06 | (0,967; 1,17) | 0,206 |
| IFN- γ (peptide S) | | | |
| Anticorpi anti-S (BAU/ml) | 1,31 | (1,09;1,56) | 0,003* |
| Tempo da ultima dose (settimane) + Anticorpi anti-S (BAU/ml) | 0,809 | (0,608;1,08) | 0,148 |
| | 1,27 | (1,05;1,52) | 0,012* |

Tabella 6. Risultati della regressione logistica uni- e multivariata per le concentrazioni interferone rispetto ai livelli di anticorpi anti-S, considerate, in ordine, individualmente e insieme al tempo dall'ultima dose (PLWH). La citochina influenza in maniera significativa l'entità della risposta umorale ($p=0,0430$) contribuendo ad aumentarne la probabilità di raggiungere concentrazioni plasmatiche di anticorpi anti-S coerenti con una marcata attivazione cellulare (OR= 1,10); tuttavia, il suo ruolo nel prevedere un possibile *outcome* è più debole ($p=0,206$), se considerato unitamente al tempo, che mostra ancora una volta un'associazione significativa con un decremento nei livelli di anticorpi al suo decorrere ($p=0,001$; OR=0,552).

Di seguito vengono riportate le matrici di correlazione (tabelle 7-8), che riassumono tutti i risultati ottenuti tramite i test statistici di correlazione e discussi finora.

| Matrice di correlazione (PLWH) | IFN- γ (peptide S) [IU/ml] | Anticorpi anti-S (BAU/ml) | Tempo da ultima dose (settimane) |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| IFN- γ (peptide S) [IU/ml] | 1,00 | $\rho = 0.493; p < 0.0001^*$ | $\rho = -0.222; p = 0.0205^*$ |
| Anticorpi anti-S (BAU/ml) | $\rho = 0.493; p < 0.0001^*$ | 1,00 | $\rho = -0.319, p = 0.0006^*$ |

Tabella 7. Matrice di correlazione relativa al gruppo PLWH.

*risultato statisticamente significativo.

| Matrice di correlazione (Controlli) | IFN- γ (peptide S) [IU/ml] | Anticorpi anti-S (BAU/ml) | Tempo da ultima dose (settimane) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| IFN- γ (peptide S) [IU/ml] | 1,00 | $\rho = 0,401$ $p = 0,0006^*$ | $\rho = -0,460$ $p < 0,0001^*$ |
| Anticorpi anti-S (BAU/ml) | $\rho = 0,401$ $p = 0,0006^*$ | 1,00 | $\rho = -0,634$ $p < 0,0001^*$ |

Tabella 8. Matrice di correlazione relativa al gruppo dei Controlli.

*Risultato statisticamente significativo.

4.6 Associazioni tra marcatori di risposta immune specifica al vaccino anti-COVID-19 e variabili caratteristiche del gruppo HIV-positivo

La produzione di IFN- γ stimolata dal peptide S mostra un andamento crescente in rapporto all'aumentare della conta T CD4⁺ recente, con livelli più alti registrati nell'intervallo compreso tra 500 e 1500 cellule/mm³: la risposta cellulare espressa dalle concentrazioni della citochina effettrice è tanto più consistente quanto maggiore è la conta dei linfociti T CD4⁺, esistendo tra le variabili una correlazione positiva ($\rho=0,228$) statisticamente significativa ($p=0,00163$).

Nel caso della risposta umorale, invece, le concentrazioni anticorpali si distribuiscono in maniera assolutamente indipendente rispetto alla conta T-cellulare ($\rho=0,01; p=ns$), riflettendo una condizione immunitaria in cui la produzione di anticorpi specifici anti-Spike non è strettamente legata al numero assoluto di cellule CD4⁺ circolanti (Figura 22).

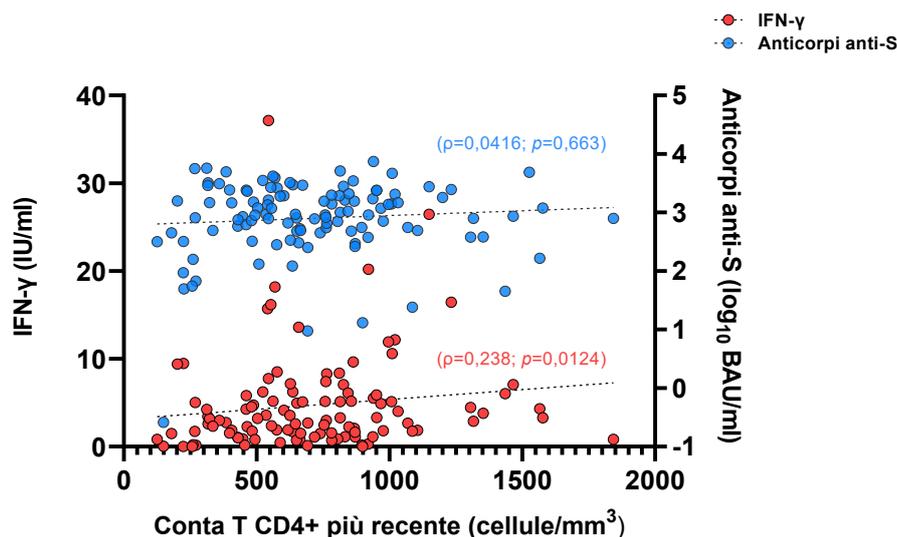


Figura 22. Grafico a dispersione che rappresenta le relazioni tra la conta T CD4⁺ e le concentrazioni di IFN- γ e anticorpi anti-S. Si osserva una correlazione positiva ($\rho=0,238$), che risulta statisticamente rilevante ($p=0,0124$), tra il numero assoluto di linfociti T CD4⁺ per microlitro e la produzione citochinica, mentre i livelli di anticorpi circolanti anti-S raggiunti non dipendono dalla suddetta conta ($\rho\sim 0$; $p=ns$). Le rette tratteggiate indicano la relazione (teorica) di dipendenza lineare ($R^2\sim 0$).

Nota: ns, non significativo.

Questo risultato mostra che il numero assoluto di linfociti CD4⁺ circolanti influenza esclusivamente la produzione di citochina effettrice senza interessare il processo di secrezione anticorpale.

Analizzando gli anticorpi anti-Spike separatamente in due sottogruppi di PLWH, con moderata (200-500 cellule/mm³) o assente (≥ 500 cellule/mm³) deplezione T-cellulare a seconda della conta recente CD4⁺, non viene riscontrata alcuna differenza significativa nell'ampiezza della risposta umorale tra i due gruppi (Mann-Whitney, $p=0,981$), confermando, così, che anche soggetti con lieve immunodeficienza vanno incontro ad una produzione anticorpale del tutto comparabile al sottogruppo con conta CD4⁺ nel range dei sani (figura 23). Peraltro, i dati indicano che la risposta umorale complessiva è di dimensioni paragonabili a quella degli individui controllo (paragrafo 4.3), infatti non c'è differenza significativa tra i due sottogruppi ed il gruppo dei Controlli (Kruskal-Wallis con confronto multiplo di Dunn, $p > 0,05$).

Per ciò che concerne la risposta T vaccino-specifica, i livelli di interferone, conseguenti alla stimolazione con peptide S di linfociti T dopo vaccinazione, correlano con la conta T CD4⁺,

che è un indicatore di immunocompetenza: più elevata è la conta linfocitaria maggiore risulta l'entità dell'attivazione di cellule CD4⁺ S-specifiche.

Suddividendo il gruppo PLWH in due classi, in accordo con una conta CD4⁺ compresa tra 200 e 500 e ≥ 500 cellule/mm³, questa associazione viene ampiamente confermata, in quanto la risposta citochinica è significativamente più bassa nel primo gruppo rispetto al secondo (mediana 2,26 IU/ml, IQR [0,84-4,25] contro 3,70 IU/ml, IQR [1,75-7,10]; Mann-Whitney, $p=0,00560$, figura 23) ma non si osserva una differenza significativa rispetto al gruppo di controllo (Kruskal-Wallis con confronto multiplo di Dunn, $p > 0,05$).

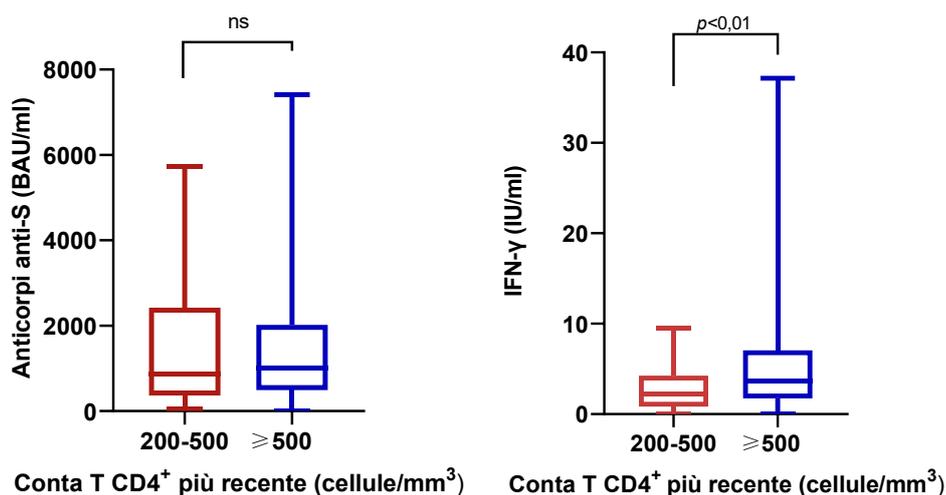


Figura 23. Box-plot che rappresentano le concentrazioni di anticorpi (a sinistra) e di IFN- γ (a destra) nei due sottogruppi di PLWH stratificati per conta CD4⁺ attuale. Non si osserva una differenza significativa ($p=0,981$) nella risposta umorale al vaccino mentre quella T-mediata è significativamente inferiore ($p=0,00560$), in mediana, nel sottogruppo che presenta una conta tra 200 e 500 rispetto a quello con conta maggiore di 500 cellule/mm³.

Valutando la relazione esistente tra le concentrazioni di IFN- γ , gli anticorpi anti-S e il *nadir* della conta T-CD4⁺, i risultati sono concordi con quelli relativi all'omonima conta assoluta nel caso degli anticorpi, mentre differiscono per quanto riguarda l'interferone; infatti gli anticorpi prodotti contro il peptide S non risultano correlati al *nadir* dei linfociti CD4⁺ ($\rho=-0,0240$; $p=ns$) e le concentrazioni rilevate non risultano significativamente differenti in mediana: si calcola una differenza di 0,0689 log₁₀ [BAU/ml] tra i due sottogruppi (*nadir* <200 e ≥ 200 cellule/mm³, rispettivamente) (Mann-Whitney, $p=0,853$).

Emerge, invece, una correlazione positiva debole ($\rho=0,162$) non statisticamente rilevante ($p=0,0915$) tra la secrezione di citochina effettrice ed il massimo decremento subito in corso di infezione da HIV; inoltre, se i livelli di interferone vengono stratificati per *nadir* maggiore/uguale o minore del valore 200 cellule/mm³, si rileva una differenza in mediana pari a 1,04 IU/ml non statisticamente significativa (Mann-Whitney, $p=0,170$).
Le relazioni trovate sono illustrate nelle figure 24 e 25.

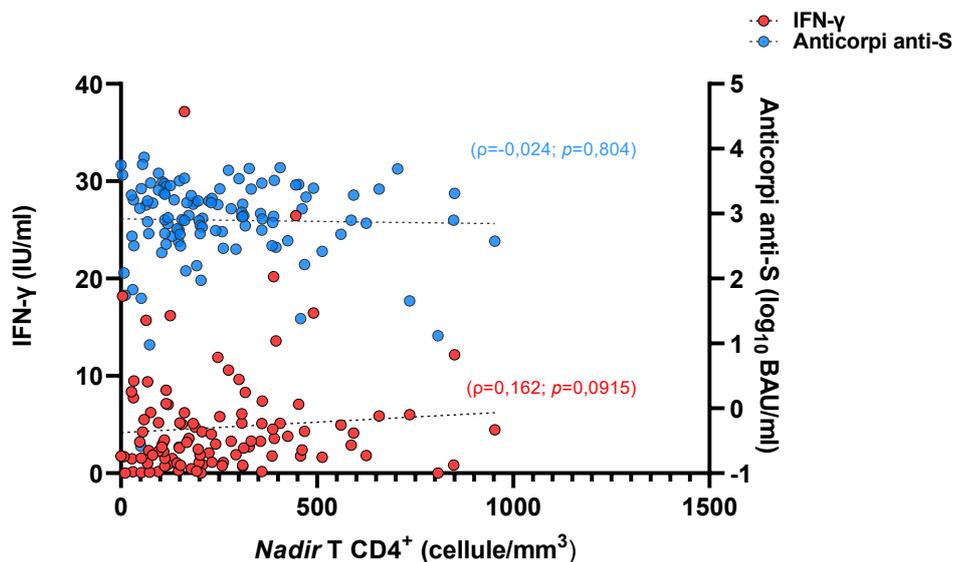


Figura 24. Rappresentazione grafica della relazione emersa tra il *nadir* della conta cellulare T CD4⁺ e le concentrazioni di IFN- γ e di anticorpi S-specifici. Si evidenzia una correlazione positiva debole ($\rho=0,162$) non statisticamente significativa ($p=0,0915$) tra il minimo assoluto nella conta CD4⁺ e la risposta cellulare misurata in base ai livelli di citochina effettrice. Non è neppure presente un nesso di interdipendenza tra le concentrazioni anticorpali e la medesima variabile di laboratorio ($\rho\sim 0$; $p=ns$). L'ipotetica relazione di dipendenza lineare viene mostrata per mezzo delle rette tratteggiate ($R^2\sim 0$).

Nota: ns, non significativo.

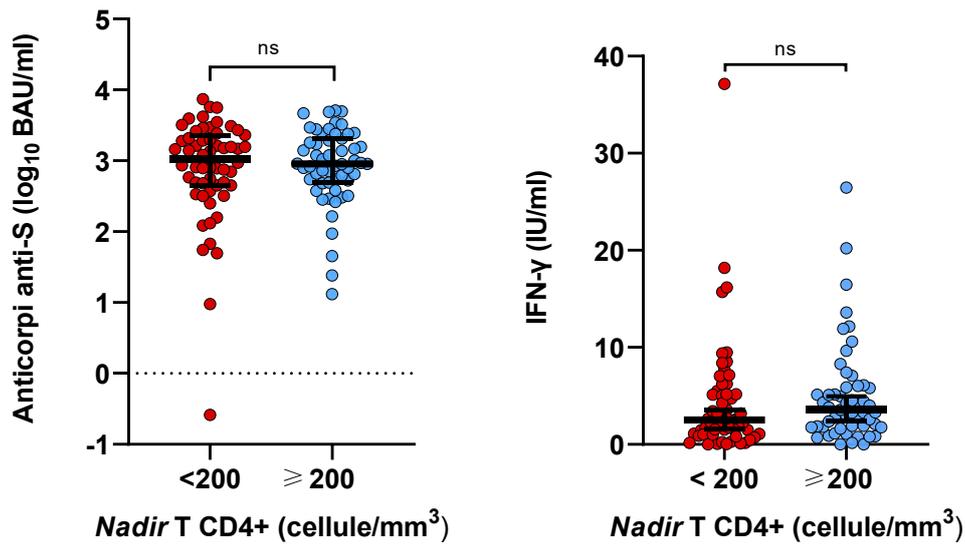


Figura 25. Rappresentazione grafica delle differenze mediane nelle concentrazioni di anticorpi anti-S suddivise e IFN- γ in due gruppi in base ad un valore di nadir <200 e ≥ 200 cellule/mm³. Non vi sono differenze significative da segnalare sia per la risposta T-mediata ($p=0,170$) che umorale ($p=0,853$).

Esaminando il rapporto $CD4^+/CD8^+$ rispetto all'entità della risposta specifica contro il peptide S, si riscontra una debole correlazione positiva, non statisticamente significativa, sia con i livelli di anticorpi anti-Spike ($\rho=0,122$; $p=0,201$) che con le concentrazioni di IFN- γ dopo stimolazione con peptide S ($\rho=0,178$; $p=0,0636$); quest'ultimo risultato, malgrado la relazione tra livelli di citochina effettrice e la conta T $CD4^+$ -cellulare, è coerente con il fatto che la media dei pazienti con diagnosi di HIV esaminati presenta un rapporto maggiore di 1 (mediana 0,923), espressione di un buon livello di immuno-ricostituzione.

Le relazioni emerse sono rappresentate in figura 26.

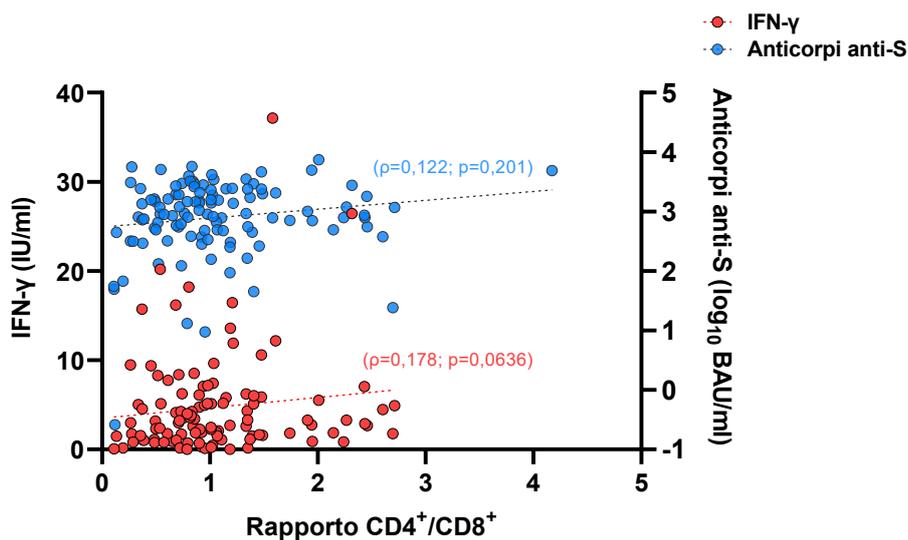


Figura 26. Relazione tra rapporto CD4⁺/CD8⁺ ed indicatori di risposta immune umorale e cellulo-mediata al vaccino. I titoli di anticorpi anti-S e le concentrazioni di IFN- γ non risultano correlati in maniera statisticamente significativa al rapporto CD4⁺/CD8⁺ ($\rho=0,122$; $p=0,201$, $\rho=0,178$; $p=0,06369$, rispettivamente).

In tabella 9 vengono sintetizzate le correlazioni tra risposta T- e B-cellulare S-specifica e parametri di laboratorio legati allo status immuno-cellulare.

| Matrice di correlazione (PLWH) | IFN- γ (peptide S) [IU/ml] | Anticorpi anti-S (Log [BAU/ml]) |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|
| Conta T CD4 ⁺ recente (cellule mm ³) | $\rho=0,238$; $p=0,0124^*$ | $\rho=0,0416$; $p=0,663$ |
| Nadir conta T CD4 ⁺ (cellule mm ³) | $\rho=0,162$; $p=0,0915$ | $\rho=-0,024$; $p=0,804$ |
| Rapporto CD4 ⁺ /CD8 ⁺ | $\rho=0,178$; $p=0,0636$ | $\rho=0,122$; $p=0,201$ |

Tabella 9. Risultati dell'analisi di correlazione tra variabili immuno-cellulari specifiche del gruppo PLWH e risposta cellulo-mediata e umorale. La conta recente T CD4⁺ correla con il rilascio di IFN- γ , che aumenta in corrispondenza di valori crescenti di linfociti CD4⁺ in numero assoluto. Nessuna relazione significativa emerge per le altre variabili testate.

* Risultato statisticamente significativo

I modelli di regressione logistica uni- e multivariata per la risposta cellulare post-vaccinazione assumono sia la conta assoluta T CD4⁺ che il rispettivo *nadir* come variabili predittive di due esiti distinti (modello binario), in base alle concentrazioni di IFN- γ raggiunte rispetto ad una soglia arbitraria, fissata sulla mediana di gruppo ($<2,99$; $\geq 2,99$)

IU/ml). La conta assoluta presenta un'associazione significativa ($p=0,041$) con le concentrazioni di citochina effettrice, nel senso che ad un incremento di 100 cellule/mm³ corrisponde un aumento della probabilità di ottenere livelli di IFN- γ superiori alla mediana (*odds ratio*: 1,13). Il risultato è coerente con la differenza nella risposta T osservata tra due sottogruppi PLWH con grado differente di immunodeficienza.

Si dimostra, così, come il numero assoluto di cellule CD4⁺ circolanti non solo è correlato positivamente con l'entità della produzione citochinica ma ne è anche un importante fattore predittivo.

Per contro, il *nadir* della conta CD4⁺ si rivela inadeguato a predire l'esito della risposta cellulo-mediata, coerentemente con l'assenza di una correlazione: ad un aumento di 100 cellule/mm³ si associa una maggior probabilità che le concentrazioni di IFN- γ siano al di sopra della mediana (*odds ratio*: 1,19), tuttavia, il risultato non è significativo ($p=0,0950$).

Infine, è da notare che nessuna variabile immunofenotipica può essere considerata valida nella stima del livello di produzione anticorpale, in accordo con l'assenza di correlazioni rilevanti e con i risultati di un modello di regressione logistica costruito secondo le stesse modalità sopra esposte. Anche in questo caso la conta T CD4⁺ recente, il *nadir* e il rapporto CD4⁺/CD8⁺ non incidono significativamente sulla probabilità che la risposta umorale sia superiore o inferiore alla mediana di gruppo.

Tutti i risultati vengono presentati nella Tabella 10.

| Regressione logistica semplice | | | |
|---|-----------------------|---------------|-------------------------|
| Variabili immunofenotipiche | IFN- γ (IU/ml) | | |
| | OR | CI (95%) | <i>p</i> value |
| Conta attuale CD4 ⁺ (cellule/mm ³) | 1,13 | (1,01; 1,28) | 0,041* |
| Nadir CD4 ⁺ (cellule/mm ³) | 1,19 | (0,971; 1,45) | 0,095 ¹ (ns) |
| Rapporto CD4 ⁺ /CD8 ⁺ | 1,15 | (0,841; 1,57) | 0,382 (ns) |
| Anticorpi anti-S (BAU/ml) | | | |
| | OR | CI (95%) | <i>p</i> value |
| Conta attuale CD4 ⁺ (cellule/mm ³) | 1,00 | (0,901; 1,12) | 0,937 (ns) |
| Nadir CD4 ⁺ (cellule/mm ³) | 0,932 | (0,774; 1,12) | 0,452 (ns) |
| Rapporto CD4 ⁺ /CD8 ⁺ | 1,12 | (0,853; 1,48) | 0,406 (ns) |

Tabella 10. Risultati della regressione logistica semplice per la risposta cellulo-mediata e umorale al vaccino in base alla conta T CD4⁺ più recente, il *nadir* e il rapporto CD4⁺/CD8⁺. Il modello è binario cioè si definiscono due esiti di risposta T/B (debole o marcata) a seconda che le concentrazioni di IFN- γ /Ig anti-S registrino valori sotto o sopra la mediana, rispettivamente (soglia fissata arbitrariamente). L'OR (*odds ratio*) è calcolato in relazione ad un incremento di 100 unità (cellule/mm³) per la conta e il *nadir* e di 0,5 unità per il rapporto. La conta CD4⁺ risulta essere un fattore predittivo statisticamente significativo dell'ampiezza della risposta cellulare e, perciò, utile nel determinare la probabilità che si verifichi una risposta di una certa entità; tuttavia, non fornisce alcuna indicazione circa la portata della produzione anticorpale. Il *nadir* e il rapporto CD4⁺/CD8⁺ non influenzano in maniera rilevante gli esiti della risposta immune specifica.

*Risultato statisticamente significativo.

¹ns, non significativo.

Il primo fattore temporale per cui si indaga un'associazione con i livelli di risposta T CD4⁺-mediata e quella umorale nei PLWH è l'età, di cui si valuta anche l'influenza sulla variazione delle conte linfocitarie.

Se le concentrazioni di IFN- γ vengono messe in relazione all'età dei pazienti ciò che emerge è una debolissima correlazione negativa, peraltro non significativa ($\rho=-0,0175$; $p=0,856$), perciò il fattore anagrafico non modifica l'entità di risposta specifica T dopo vaccinazione e non ha alcun valore predittivo.

A conferma di questa evidenza anche l'effetto dell'età sulla conta assoluta dei linfociti T CD4⁺ si dimostra nullo; infatti, si osserva una correlazione negativa trascurabile ($\rho=-0,0852$) priva di rilevanza statistica ($p=0,369$).

I risultati, inseriti nel grafico della figura 27, evidenziano l'assenza di una associazione tra il fattore "età", il numero di linfociti T CD4⁺ per microlitro e le concentrazioni di IFN- γ , misura quantitativa delle dimensioni della reazione T-mediata in risposta al peptide S.

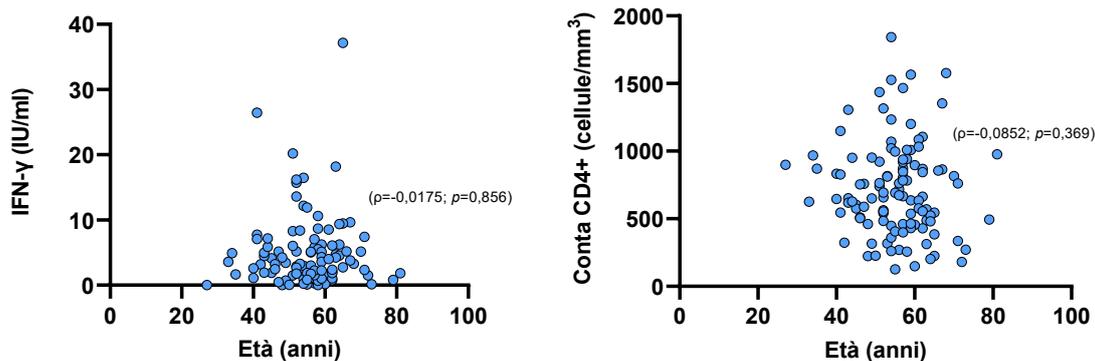


Figura 27. Relazione tra conta T CD4⁺-cellulare, concentrazioni di IFN- γ ed età dei PLWH. I grafici a dispersione fanno osservare che il fattore anagrafico non presenta alcuna associazione significativa tanto con la conta assoluta T CD4⁺ quanto con i livelli di IFN- γ circolante ($p=ns$ in entrambi i casi). Nota: ns, non significativo.

Suddividendo arbitrariamente per range di età i pazienti con diagnosi progressiva di HIV e confrontando la risposta cellulo-mediata S-specifica in ogni singola classe individuata (età 25-50, 51-60, >60 anni) si ottiene un risultato in linea con i precedenti: le mediane delle concentrazioni di IFN- γ misurate nelle tre classi di età indicate non differiscono in maniera significativa (Kruskal-Wallis, $p=0,532$).

Osservando il grafico in figura 28, si evince la risposta cellulo-mediata, valutata in tre gruppi di individui di tre fasce di età diverse, è tendenzialmente sovrapponibile, con la mediana registrata nel range di età superiore a 60 anni (3,91 IU/ml), lievemente più alta rispetto a quella della fascia 25-50 anni (3,30 IU/ml) e 51-60 (2,68 IU/ml). In più si nota che, proprio nella fascia con valore mediano più basso (51-60 anni), il 25% dei pazienti raggiunge le più alte concentrazioni di citochina effettrice.

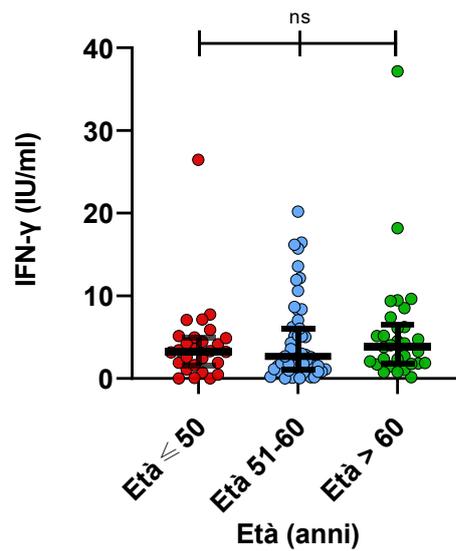


Figura 28. Le tre classi di età in cui vengono ripartiti arbitrariamente i PLWH al fine di valutare eventuali differenze nella risposta effettrice T al vaccino in rapporto al fattore anagrafico. Non si rilevano differenze significative intergruppo ($p=0,532$) e le classi di età non incidono sull'entità della risposta cellulare al peptide S.

L'età non ha alcuna influenza rilevante neppure sulla produzione anticorpale anti-S come si osserva dal grafico in figura 29, che illustra le concentrazioni di anticorpi in funzione del fattore "età".

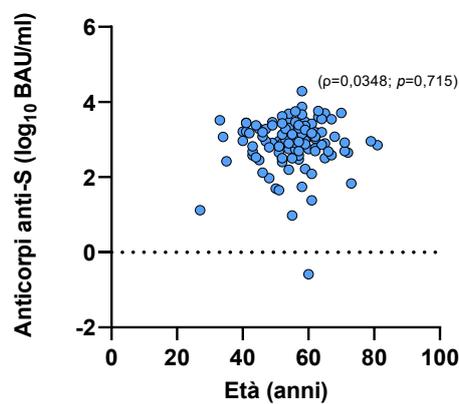


Figura 29. Grafico a dispersione che mette in relazione l'età dei PLWH con l'entità della risposta umorale misurata mediante le concentrazioni di anticorpi anti-S. La distribuzione dei valori non mostra alcuna associazione con l'età ($\rho \sim 0$; $p=0,715$).

Nota: ns, non significativo.

La suddivisione per classi di età restituisce un risultato analogo, presentato in figura 30, rafforzando l'evidenza di non correlazione tra anticorpi S-specifici ed età: le concentrazioni mediane di anticorpi anti-S sono pressoché equivalenti, con la fascia di età 51-60 anni che fa osservare un valore di 2,97 \log_{10} [BAU/ml] contro i 3,02 di quella compresa tra 25-50 e i 2,94 \log_{10} [BAU/ml] del range maggiore di 60 anni, rispettivamente. L'andamento in mediana della risposta umorale risulta, perciò, sovrapponibile indipendentemente dalle classi di assegnazione basate sull'età (Kruskal-Wallis, $p=0,839$).

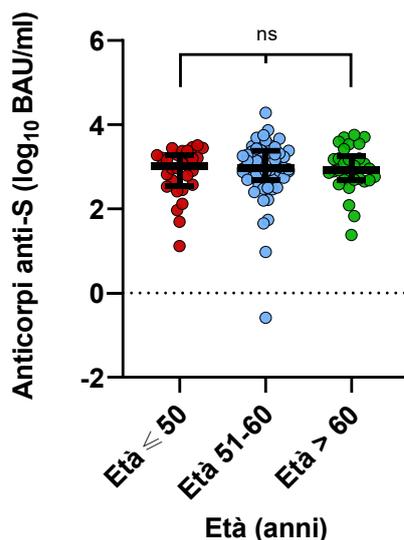


Figura 30. Rappresentazione della suddivisione della risposta umorale per classi di età. Il grafico evidenzia una quasi equivalenza nei valori mediani delle concentrazioni anticorpali in tre gruppi di fascia d'età diversa, dimostrando che non c'è differenza significativa tra i risultati ottenuti ($p=0,839$).

Il secondo fattore temporale, di cui si studia il possibile legame con l'esito della risposta cellulare e anticorpale anti-S, è il tempo trascorso dalla diagnosi di infezione da HIV fino al momento dell'arruolamento (o della vaccinazione).

I risultati ottenuti dallo studio di correlazione fanno osservare che l'andamento sia delle concentrazioni di IFN- γ che di quelle di anticorpi anti-Spike non è associato alla data di diagnosi di infezione virale.

I grafici a dispersione presentati in figura 31 illustrano questi risultati.

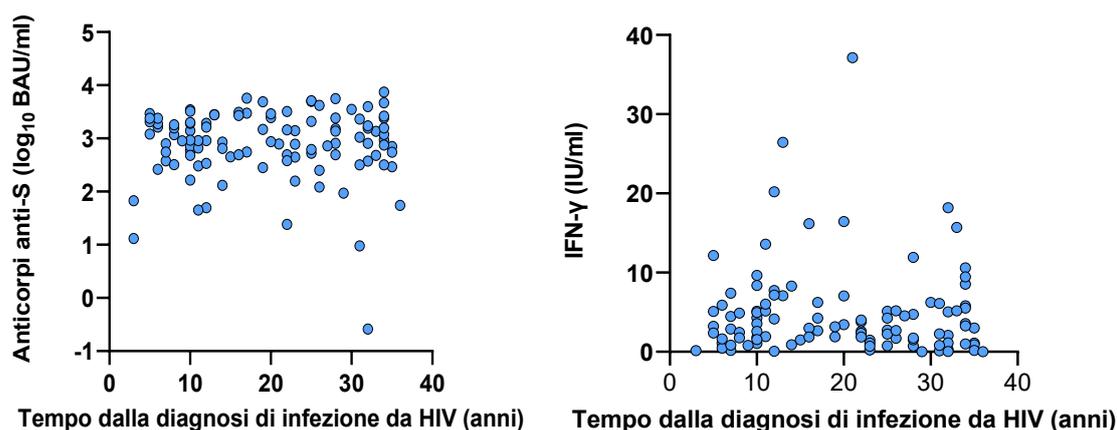


Figura 31. Vengono mostrati i grafici a dispersione che esplorano la relazione tra il tempo dalla diagnosi di infezione da HIV e le risposte immunitarie specifiche post-vaccinazione. Non si evidenzia alcuna associazione significativa sia con le concentrazioni di anticorpi anti-S che con i livelli di IFN- γ ($p \sim 0$, $p = ns$).

I risultati concordano nel dimostrare che né l'età dei PLWH né la durata di malattia mostrano relazioni con la risposta immune specifica nei confronti del peptide S del vaccino anti-COVID-19.

Se le variabili temporali vengono utilizzate come fattori predittivi in un modello di regressione logistica multivariata per stimare la probabilità che ad una certa età e dopo un determinato tempo dalla diagnosi di malattia corrisponda una reazione immune specifica al vaccino debole (0) o buona (1), si ricavano risultati in accordo con quanto già trovato: le variabili scelte non hanno un effetto significativo ($p = ns$ in entrambi i casi) nella previsione di un certo outcome di risposta, più o meno consistente a seconda che i livelli di IFN- γ e anticorpali siano maggiori/uguali o minori alla mediana della distribuzione, rispettivamente. La tabella 11 riporta l'*odds ratio* (riferito ad un incremento per decade) con il rispettivo intervallo di confidenza e il p value per ogni variabile inclusa nell'analisi di regressione logistica semplice.

| Regressione logistica semplice | | | | | | |
|--------------------------------|---------------|------------------|-------------------------|------------------|------------------|----------------|
| Variabili temporali | IFN- γ | | | Anticorpi anti-S | | |
| | OR | CI (95%) | <i>p</i> value | OR | CI (95%) | <i>p</i> value |
| Età (anni) | 0.854 | (0,5513; 1,3235) | 0.481 ¹ (ns) | 0,7801 | (0,5013; 1,2139) | 0,271 (ns) |
| Tempo da diagnosi (anni) | 1.02 | (0,6851; 1,5179) | 0.923 (ns) | 1,1235 | (0,7519; 1,6787) | 0,570 (ns) |

Tabella 11. Regressione logistica semplice applicata alla risposta cellulare e umorale per stimarne l'andamento in funzione dell'età e del tempo trascorso dalla diagnosi di infezione da HIV. Il modello è binario, ossia considera due esiti di risposta, debole o robusta, a seconda che i livelli di citochina e le concentrazioni anticorpali siano al di sotto o al di sopra del valore mediano, rispettivamente. I risultati sintetizzati in tabella mostrano l'inadeguatezza delle variabili temporali nel fornire un modello predittivo di outcome statisticamente valido.

¹ns, non significativo.

5. DISCUSSIONE

Il presente studio a campionamento trasversale si è proposto di valutare l'entità della risposta immune specifica (cellulare e umorale) innescata da due dosi di vaccino anti-COVID-19, con schema principalmente a mRNA, in pazienti con infezione pregressa da HIV COVID-19-naïve; quasi tutti i partecipanti HIV sono ben controllati tramite terapia antiretrovirale combinata (cART), con stabile soppressione della carica virale plasmatica e conta T CD4⁺ in fase di recupero o apprezzabilmente ricostituita, eccetto quattro.

Il campione di PLWH indagato esclude quella quota di pazienti con infezione da HIV non controllata (carica virale non soppressa, bassa conta T CD4⁺) dove uno stato di severa immunodeficienza può compromettere lo sviluppo di una robusta reazione specifica al peptide S del vaccino^{[76]-[80]} o, comunque, non permette di escludere che si generi una risposta debole, come accade nel caso di vaccini specifici per altri patogeni^{[81]-[84]}; dunque, i risultati che vengono discussi sono validi solo per quello spettro di pazienti con conta superiore a 200 cellule/mm³.

Inoltre, non si sta valutando l'efficacia bensì le dimensioni della risposta, indirettamente, in funzione delle concentrazioni di una citochina effettrice (IFN- γ), prodotta dai linfociti T attivati, e del titolo di anticorpi plasmatici che indica l'avvenuta stimolazione delle cellule B. Perciò, i risultati non descrivono l'efficacia in termini protezione offerta dal vaccino nei confronti dell'infezione ma sono, piuttosto, orientati alla comprensione della capacità del vaccino stesso di indurre una risposta consistente in un gruppo di individui con un determinato stato immuno-cellulare.

Ciò premesso, i risultati ottenuti consentono di ipotizzare che un individuo HIV-sieropositivo con infezione ben controllata dalla terapia antiretrovirale possa risultare efficacemente protetto nei confronti di SARS-CoV-2 grazie alla vaccinazione con schema a mRNA, in analogia con i dati emersi dagli studi di efficacia di *Comirnaty* e *Spikevax* in partecipanti volontari sani^{[54]-[56]}.

Sono necessari ulteriori studi di confronto tra soggetti HIV-infetti e sani per stabilire se l'efficacia del vaccino differisca in base alle caratteristiche dei riceventi, soprattutto in quella classe di PLWH a maggior rischio di malattia grave da SARS-CoV-2 e di esito fatale, che più di tutti beneficerebbe della vaccinazione.

La coorte indagata, composta da 114 PLWH adulti e comparata con un gruppo di 72 controlli sani di simile età, mostra una risposta T-mediata e anticorpale, diretta contro il peptide S del vaccino, di ampiezza del tutto equivalente a quella osservata nel gruppo di controllo.

Ciò dimostra che la stimolazione dei linfociti T e B con peptide S nei PLWH produce una reazione specifica apprezzabile dove l'infezione da HIV non sembra influenzare la capacità del sistema immunitario di reagire ad un antigene esterno rispetto agli individui sani.

Degno di nota il fatto che SARS-CoV-2 rappresenta un germe “nuovo”; ciò lascerebbe ipotizzare che la ricostituzione immunologica indotta dalla terapia antiretrovirale non solo sia in grado di ripristinare risposte “sopite” contro germi già precedentemente incontrati dal paziente con infezione da HIV (ad esempio i patogeni opportunisti), ma che possa anche conferire la capacità di rispondere ad antigeni contro i quali non c'è mai stato alcun *priming* precedente.

In merito alla risposta umorale, è opportuno precisare che la mancata esecuzione della misurazione dell'attività neutralizzante anticorpale costituisce un limite di questo lavoro, impedendo di correlare il dato quantitativo (entità della produzione di anticorpi) con quello funzionale o qualitativo (la loro capacità bloccante nei confronti della proteina S).

Ad ogni modo, diversi studi confermano che gli individui HIV-sieropositivi sotto controllo virologico mettono in atto una risposta umorale post-vaccinazione simile a quella dei soggetti sani ^{[85],[86]}, con una correlazione tra il titolo di Ig anti-RBD e l'attività anticorpale neutralizzante, che cresce tra una dose e l'altra ^{[85],[87]}.

Vi sono, d'altro canto, evidenze di una risposta anticorpale di ampiezza significativamente ridotta nei soggetti con infezione da HIV rispetto ai controlli ^{[77],[87]-[90]}. *Levy I. et al.* notano una risposta più debole in questi pazienti rispetto ad un gruppo di controllo sano dopo doppia dose di *Comirnaty*, ma occorre considerare che le rilevazioni sono state effettuate, rispettivamente, dopo una finestra temporale mediana di 18 giorni nel primo gruppo e di 26 nel secondo; avendo ottenuto risposte di grandezza sovrapponibile a partire dai 28 giorni dopo l'ultima vaccinazione, sia nel nostro studio che in altri ^{[85],[86]}, è presumibile che la differenza riscontrata sia attribuibile ad una precoce misurazione dei titoli anticorpali anti-S nel PLWH quando, verosimilmente, non era ancora stato raggiunto il picco massimo.

È verosimile ipotizzare che una eventuale riduzione nella risposta immune al vaccino sia connessa con fattori sociodemografici e clinici, quali età, sesso, comorbidità, non

completamente sovrapponibili tra i partecipanti PLWH e controlli: infatti, dopo un'analisi corretta per età e sesso *Heftdal LD et al.* ^[90] dimostrano, a distanza di due mesi dalla vaccinazione, la scomparsa di una significativa differenza nei livelli di anticorpi tra i due gruppi.

Comunque, nonostante una produzione di anticorpi Spike-specifici più ridotta nel gruppo HIV, la capacità neutralizzante raggiunta è risultata pari a quella misurata nei soggetti sani, presentando, peraltro, una correlazione con i titoli anticorpali ^{[77],[85],[87]-[89]}; questo potrebbe indicare che il vaccino induce una risposta umorale quantitativamente più debole, ma ugualmente valida da un punto di vista funzionale, in PLWH rispetto agli individui non infetti.

In sintesi, nel presente studio, i risultati relativi alla produzione anticorpale indotta da vaccino a mRNA nei soggetti con infezione da HIV ben controllata sono perfettamente in linea con le evidenze emergenti in letteratura, che indicano un'ottima risposta umorale a diverse strategie di vaccino, ampiamente equiparabile a quella generata dagli individui HIV-sieronegativi ^{[78]-[80],[85],[86],[92],[93]}.

Tuttavia, non è ancora completamente chiarito l'effetto della vaccinazione sulla produzione anticorpale nei pazienti HIV con fallimento virologico e/o severo stato di immunodeficienza, connotato da una conta T CD4⁺ inferiore a 200 cellule/mm³; per ora un numero esiguo di studi incentrati sulla valutazione della risposta umorale in questo sottogruppo specifico di pazienti ha evidenziato una scarsa risposta umorale rispetto agli individui sani, con titoli di Ig anti-Spike e relativa attività neutralizzante nettamente più ridotti, dopo prima o seconda dose di diversi vaccini ^{[77]-[80]}.

Inoltre, elevati livelli di replicazione virale e una bassa conta T CD4⁺ (< 70 cellule/mm³), sembrano essere associati ad una totale assenza di sviluppo di anticorpi anti-S e a mancanza di attività neutralizzante, dopo doppia dose di vaccino ^[76].

Nel presente studio abbiamo dimostrato che la vaccinazione anti-SARS-CoV-2, in particolare con schema a mRNA, è in grado di indurre, in PLWH, una risposta T-mediata di entità simile a quella osservata in soggetti sani, in maniera analoga a quanto osservato per la risposta umorale, suggerendo il possibile sviluppo di una risposta coordinata Spike-specifica efficace e protettiva.

In letteratura, nonostante i dati disponibili circa la caratterizzazione della risposta T-cellulare alla vaccinazione in PLWH siano limitati, vi sono prove che dimostrano la capacità di

indurre una consistente attivazione dell'immunità effettrice S-specifica, sia cellulare che umorale, di ampiezza non diversa rispetto ad un sano COVID-19-naïve, dopo un ciclo di vaccinazione standard a mRNA [79],[86].

L'immunità adattativa viene stimolata anche da altri tipi di vaccino: *Frater J. et al.* [92], indagando la risposta cellulare evocata dopo due dosi di ChAdOx1 nCoV-19 in due gruppi di pazienti, con e senza infezione da HIV, osservano un notevole incremento rispetto ai valori baseline di IFN- γ e una marcata attività proliferativa T-linfocitaria (CD4⁺ e CD8⁺), senza differenze significative fra i due gruppi; *Feng et al.*[93] mostrano che un vaccino inattivato è in grado di scatenare una marcata risposta da parte di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ Spike-specifici, di entità simile tra PLWH e sani.

In entrambi i casi l'attivazione delle cellule T è accompagnata da una simultanea risposta anticorpale di dimensioni comparabili tra le due categorie, provando indiscutibilmente il coinvolgimento di diversi meccanismi protettivi nei confronti di COVID-19; analogamente, in un gruppo di PLWH in fase di ricostituzione immunitaria (o ben ricostituito) è stata rilevata una risposta specifica contro l'infezione naturale da SARS-CoV-2 di entità analoga a quella indotta negli individui sieronegativi per HIV [53], confermando ancora una volta l'attivazione sinergica degli stessi bracci effettori anche in un contesto totalmente differente. Alla luce di ciò, sembra chiaro che l'infezione cronica da HIV in condizioni di soppressione viremica non pregiudica l'attivazione dell'immunità adattativa dopo vaccinazione anti-SARS-CoV-2, che avviene, anzi, secondo le medesime dinamiche descritte durante l'infezione naturale, nei sani convalescenti o COVID-19-naïve vaccinati con doppia dose; quindi è ragionevole presumere che, anche nel gruppo PLWH, il vaccino possa stimolare efficacemente la comparsa parallela di linfociti T e B virus-specifici, verosimilmente capaci di generare una risposta multifunzionale e integrata, potenzialmente protettiva nei confronti di COVID-19 [58],[60],[61],[95]-[97], ponendo le basi per lo sviluppo di una memoria immunologica *long-lasting*, candidata a fornire una copertura prolungata a distanza di tempo dalla vaccinazione.

Probabilmente la cART gioca un ruolo essenziale nel consentire una risposta adeguata alla vaccinazione anti-COVID-19 attraverso un progressivo recupero da uno stato di immunodeficienza: controllando la replicazione virale ed eliminando, in parte, le alterazioni a carico, primariamente, dei linfociti T CD4⁺, si restituisce al sistema immunitario una popolazione fondamentale per la coordinazione delle risposte antigene-specifiche. Il

ripristino da una condizione di disfunzione immunitaria si riflette non solo in una più forte ed efficace attivazione dei linfociti T da parte del peptide S ma anche in una migliore funzione *T-helper* nei confronti di linfociti B Spike-specifici, guidando in questo modo una consistente reazione anticorpale al vaccino anti-COVID-19.

Dalla nostra osservazione trasversale la risposta specifica al vaccino risulta spiccata nel primo mese successivo all'ultima dose di vaccino ma decresce in maniera continua nel tempo sia nei pazienti con HIV che nei partecipanti sani; è da notare che, mentre il declino dei livelli di IFN- γ è graduale, i titoli di anticorpi anti-S diminuiscono più rapidamente nel tempo.

Una simile evoluzione temporale è stata descritta in uno studio spagnolo svolto su volontari sani vaccinati, precedentemente esposti o non esposti a SARS-CoV-2 [58], dove le risposte cellulo-mediata ed umorale iniziano una discesa dopo il primo mese, e la durata della risposta effettrice specifica tenderebbe ad esaurirsi nel giro di mesi, pur rimanendo, comunque, apprezzabile fino a 2-3 mesi post-vaccinazione.

Questi dati, tuttavia, non forniscono alcuna informazione sul correlato di protezione dall'infezione oltre il suddetto periodo; in altre parole, non si è in grado di stabilire, solo in base alla riduzione progressiva dell'attività immunitaria nei primi mesi dalla seconda dose di vaccino, il livello di copertura residua vaccino-indotta nei confronti dell'infezione da SARS-CoV-2. Oltretutto è da sottolineare il ruolo della memoria immunologica T- e B-mediata anti-Spike, stimolata precocemente dopo la prima dose di vaccino e notevolmente potenziata a seguito della seconda [95],[96],[98],[99]: i linfociti T CD8⁺ precursori di memoria Spike-specifici, che formano rapidamente una popolazione stabile, insieme ad un forte incremento nella frequenza di cellule B di memoria IgG⁺ anti-S, potrebbero rappresentare il presupposto per mantenimento di una risposta cellulare prolungata anche a distanza della vaccinazione. Al riguardo, il gruppo di *Vergori A. et al.* ha recentemente fornito un dato preliminare, riportando un aumento significativo della risposta anticorpale dopo la terza dose di vaccino a mRNA (*booster*) in PLWH che hanno completato il ciclo di vaccinazione primaria, senza notare differenze tra sottogruppi in base alla conta T CD4⁺; perciò, è ipotizzabile che la dose aggiuntiva (eventualmente una quarta dose) possa contribuire ad evocare/potenziare una risposta immune anti-SARS-CoV-2 anche in (una parte dei) soggetti immunologicamente più compromessi [102]. Questo stesso concetto è stato, peraltro,

evidenziato di recente anche in altri gruppi di pazienti affetti da immunodeficienza e/o da patologie oncologiche ed onco-ematologiche [103]-[105].

Un *trial* clinico randomizzato che comprendeva vaccinati con doppia dose di *Comirnaty* ne ha messo in evidenza una riduzione dell'efficacia dal 95% al 91,3% dopo 6 mesi, ribadendone, comunque, il potenziale protettivo nei confronti di COVID-19, anche a distanza di tempo dal completamento della vaccinazione primaria [56]. Analoghi risultati sono stati ottenuti per *Spikevax* e mostrano che, nonostante il declino nel titolo di anticorpi leganti RBD e neutralizzanti, il vaccino a mRNA ha la capacità di suscitare una risposta immunitaria potenzialmente duratura [94].

I dati ricavati dimostrano un importante ruolo predittivo del tempo post-vaccinazione per quanto concerne lo sviluppo e la persistenza della risposta specifica, a una certa distanza temporale dal completamento della vaccinazione standard: ogni due settimane trascorse dall'ultima dose, la risposta cellulo-mediata e umorale tendono ad attenuarsi costantemente, raggiungendo livelli al di sotto della mediana di gruppo, coerentemente con la correlazione negativa precedentemente discussa. Tuttavia, un valore sotto-mediano non è indicativo di risposta assente bensì di un verosimile depotenziamento, in termini di attività T e B-cellulare, che non implica necessariamente una riduzione della protezione vaccino-indotta.

Analizzando il legame tra i due bracci effettori dell'immunità specifica coinvolti nella risposta al vaccino anti-COVID-19 nel gruppo PLWH, risulta una forte associazione, confermata anche da *Antinori et. al* [79], tra la produzione di IFN- γ ed i titoli di anticorpi leganti la proteina S, simile a quella identificata nei partecipanti sani, indicando una possibile cooperazione pienamente funzionale tra cellule T e B nella risposta vaccino-specifica. Infatti, nel gruppo non esposto ad HIV è stato evidenziato che la prima dose di vaccino evoca un'intensa reazione cellulare, guidata prevalentemente da linfociti T CD4⁺ T_{H1} e T_{FH} Ag-specifici, dove la frequenza di cellule T_{FH} attivate correla positivamente con lo sviluppo di una più potente attività neutralizzante anticorpale dopo seconda dose di vaccino [96].

In sintesi, la correlazione positiva tra l'attivazione T-cellulare e il titolo di anticorpi anti-Spike riflette verosimilmente un buon funzionamento dei processi che hanno luogo all'interno dei centri germinativi e sottolinea l'importanza di un'efficace stimolazione dei linfociti T CD4⁺ follicolari Ag-specifici, da cui dipende strettamente lo sviluppo di una risposta umorale ottimale; è da notare, a tal riguardo, che la conta delle cellule T CD4⁺ periferiche non ha alcun effetto rilevante sulla produzione anticorpale, avvalorando il

concetto che l'entità dell'attivazione delle suddette cellule e le loro caratteristiche funzionali, piuttosto che la mera conta numerica circolante, esplicano un ruolo decisivo nei confronti delle cellule B Spike-specifiche.

Come nei soggetti sani sottoposti a due dosi di vaccino ^{[58],[61]}, anche nei pazienti HIV⁺ si rileva una risposta T-mediata polifunzionale anti-S, dove le concentrazioni di IFN- γ correlano non solo con quelle di IL-2, segno di un'attivazione ben coordinata del subset T, ma anche con i titoli di anticorpi anti-RBD, a dimostrazione dell'effettiva interazione tra diverse cellule effettrici per produrre una risposta adattativa organizzata ^[79].

Da tale somiglianza tra PLWH e sani, sebbene la nostra valutazione dell'attivazione T-cellulare si limiti solo ai linfociti IFN- γ ⁺, si può dedurre il ruolo chiave di queste cellule nel guidare la risposta umorale S-specifica, indipendentemente dall'infezione cronica da HIV.

Dunque, i risultati presentati suggeriscono che la vaccinazione standard anti-SARS-CoV-2 induce una risposta effettrice S-specifica, cellulare e umorale, adeguatamente orchestrata, da ritenersi ragionevolmente un presupposto fondamentale per lo sviluppo di una protezione efficace contro SARS-CoV-2, analogamente a quanto suggerito dai dati provenienti dalla risposta immune specifica a COVID-19 in soggetti non vaccinati, HIV-sieronegativi ^{[18]-[21]}.

I dati a nostra disposizione sono in grado di rispondere al quesito sollevato da *Lombardi A. et al.*, che, partendo dall'osservazione di una robusta reazione anticorpale in una coorte di pazienti HIV⁺ con buono status immunologico (conta al di sopra delle 200 cellule/mm³ e alto rapporto CD4⁺/CD8⁺) hanno ipotizzato la possibilità di ottenere una risposta cellulo-mediata altrettanto consistente dopo vaccinazione, interrogandosi anche sull'esistenza di una relazione reciproca tra i due bracci effettori dell'immunità adattativa. Un tale interrogativo trova giustificazione nel riscontro negativo di una correlazione tra risposta T-cellulare complessiva o Spike-specifica e il titolo di anticorpi IgG anti-S1 o la capacità neutralizzante, rispettivamente, in PLWH esposti a SARS-CoV-2, contrariamente a quanto rilevato nei corrispettivi sani, dopo guarigione da COVID-19 ^[53].

Per concludere, in base alle osservazioni discusse finora, i pazienti con infezione da HIV sono capaci di montare una risposta effettrice S-specifica, cellulo-mediata e umorale, di entità comparabile rispetto ai soggetti sani e correlate l'una con l'altra, dopo vaccinazione primaria. Ne consegue un aspetto di estrema rilevanza: che il vaccino, in PLWH con conte di T CD4⁺ superiori a 200 cellule/mm³, induce una risposta coordinata tra i due principali effettori dell'immunità specifica, la quale potrebbe essere un presupposto essenziale per

l'innalzamento di una barriera immunologica efficace contro SARS-CoV-2 [19],[21]. Tale caratteristica non sembra, peraltro, essere presente dopo il contatto diretto con il virus stesso [53].

Da un punto di vista generale, poiché i livelli di anticorpi plasmatici anti-Spike sembrano riflettere il grado di attivazione T CD4-cellulare, e viceversa, tanto le concentrazioni di IFN- γ quanto quelle anticorpali avrebbero una pari importanza nel suggerire l'avvenuta risposta specifica al vaccino e la presenza di una potenziale protezione nei confronti dell'infezione da SARS-CoV-2.

È verosimile, quindi, supporre che un'energica reazione dei linfociti T produca una risposta anticorpale altrettanto forte, come una scarsa produzione di anticorpi sia associata ad una debole attivazione delle stesse cellule T; d'altra parte, i risultati della regressione logistica sottolineano il ruolo predittivo di entrambi i parametri di risposta specifica, l'uno rispetto all'altro, nel senso che per ogni incremento dell'attivazione dei linfociti T è più probabile che venga prodotta una reazione anticorpale di entità significativa e viceversa.

Tuttavia, pur conoscendo l'andamento della risposta specifica al peptide S, che tende a indebolirsi nel tempo, e la relazione che lega le due risposte, non è chiaro se la permanenza di una valida risposta sia influenzata dai livelli raggiunti subito dopo la vaccinazione.

In particolare, resta da capire se nei pazienti che producono una robusta risposta al vaccino fin dall'inizio, essa sia destinata a perdurare maggiormente nel tempo e se, al contrario, in quelli che danno luogo ad una reazione di debole entità essa si riveli anche meno persistente. Finora è noto che più tempo passa più la risposta tende ad attenuarsi dal punto di vista quantitativo, ma sapere se le concentrazioni di partenza (immediatamente dopo completamento della vaccinazione standard) di IFN- γ e di anticorpi anti-S condizionino la rapidità con cui si verifica il decremento, resta un quesito irrisolto; studi longitudinali che misurino la persistenza della risposta specifica a differenti intervalli di tempo post-vaccinazione, mettendola in relazione al massimo livello raggiunto al termine del ciclo vaccinale, potrebbero contribuire a chiarire questo aspetto.

L'assenza di correlazione tra concentrazioni di Ig anti-S e la conta T CD4-cellulare suggerisce che questo parametro non ha un impatto significativo sull'esito della risposta umorale alla vaccinazione contro SARS-CoV-2 in PLWH con viremia soppressa, come suggerito da altri studi [85],[87]-[90],[92]; perciò, sarebbe lecito supporre che una conta

moderatamente ridotta non precluda il raggiungimento di una risposta umorale consistente, purché vi sia un'adeguata stimolazione dei linfociti T CD4⁺ indotta dal peptide S.

In effetti, nel presente studio la risposta anticorpale appare strettamente connessa con i livelli di IFN- γ a suggerire che è la capacità di attivazione T-linfocitaria a svolgere un ruolo determinante nell'innescare di una marcata reazione anticorpale, piuttosto che il numero assoluto di cellule, in quanto la produzione di Ig Spike-specifiche dipende dall'efficacia del contatto tra linfociti T_{FH} effettori e linfociti B.

Al contrario, il numero assoluto di linfociti T CD4⁺ influenza l'entità della risposta T nella nostra coorte. In accordo con le precedenti osservazioni, la stratificazione dei soggetti in base alla conta T CD4-cellulare, evidenzia una significativa differenza tra i livelli di IFN- γ nelle due categorie con immunodeficienza lieve o assente, a fronte, però, di un titolo anticorpale S-specifico che appare simile nei due gruppi.

Degno di nota il fatto che *Frater et al.*^[92] dimostrano che pazienti HIV⁺ vaccinati con doppia dose di ChAdOx1 nCoV-19 (*Vaxzevria*) e buono status immunologico (conta T CD4⁺ > 350 cellule/mm³) montano una reazione anticorpale al vaccino di dimensioni paragonabili al gruppo HIV⁻ e non correlata alla conta T CD4⁺ al momento dell'arruolamento.

In sostanziale accordo anche il dato di *Lombardi A. et al.*^[85], che rilevano che i titoli di anticorpi IgG anti-RBD della proteina S di SARS-CoV-2, stratificati in base alla conta T CD4⁺ (<350 cellule/mm³, 350-500 cellule/mm³, >500 cellule/mm³) al momento della vaccinazione, non risultano differenti tra PLWH e sani, dimostrando che il numero assoluto di linfociti CD4⁺ circolanti non influenza la risposta umorale evocata dal vaccino, in pazienti HIV⁺ stabili, aviremici e immunoricostruiti grazie alla cART.

Diversamente dai nostri riscontri, *Antinori et al.*^[79] individuano una risposta umorale comparabile, per entità e capacità neutralizzante, tra PLWH con immunodeficienza minore (MID, conta CD4⁺ [200-500 cellule/mm³]) e assente (NID, conta CD4⁺ [>500 cellule/mm³]), ma significativamente diversa rispetto ai controlli sani; inoltre, una condizione di MID è risultata associata solamente ad una diminuzione dei titoli anti-RBD.

Tuttavia, il dato più importante ricavato da questo studio riguarda i soggetti HIV⁺ con immunodeficienza severa (SID, conta CD4⁺ < 200 cellule/mm³), dove la risposta umorale appare notevolmente ridotta in confronto ai corrispettivi in fase di recupero immunologico e ai sani; questo suggerisce che la conta T CD4⁺ al tempo della vaccinazione è un parametro che verosimilmente incide sull'immunogenicità del vaccino, per lo più in soggetti con

immunodeficienza grave (SID), coerentemente con i risultati di altri studi che hanno incluso PLWH con una bassa conta T CD4⁺ [77],[80].

La risposta cellulo-mediata nel nostro campione con infezione da HIV è significativamente diversa tra i sottogruppi con immunodeficienza minore (MID) e assente (NID), ma si dimostra di entità comparabile a quella evocata dal vaccino in un gruppo di soggetti sani, indicando che il miglioramento della funzione delle cellule T grazie alla cART ovvero il grado di ricostituzione probabilmente prevalgono sulla conta assoluta T CD4⁺ nel condizionare l'entità della risposta cellulo-mediata alla vaccinazione.

Nello studio di *Antinori et al.* [79] si segnala che la risposta cellulare è simile tra MID e NID, mentre risulta significativamente ridotta in MID rispetto ad un gruppo sano; come per le Ig anti-S, una conta inferiore a 200 cellule/mm³ è ritenuta un fattore predittivo indipendente di una debole risposta T-mediata al vaccino.

Nel complesso, le evidenze scientifiche finora disponibili mostrano, dunque, che un ciclo di vaccinazione primario anti-COVID-19 in PLWH che ricevono cART induce una risposta effettrice umorale e cellulo-mediata la cui entità dipende, in una certa misura, dal grado di immunodeficienza, espresso mediante la conta assoluta dei linfociti T CD4⁺: la severa immunosoppressione (conta < 200 cellule/mm³) comporta una riduzione notevole dei titoli di Ig anti-RBD, della capacità di neutralizzazione, e dell'attivazione delle cellule T [77],[79],[80], fino alla completa assenza in caso di infezione da HIV non controllata [76]; invece, l'assenza di immunodeficienza, con ottimo ripristino della conta (> 500 cellule/mm³), promuove una risposta di ampiezza spesso paragonabile a quella rilevata nei sani HIV-sieronegativi [79],[85],[92].

Infine, la lieve immuno-compromissione (conta compresa tra 200 e 500 cellule/mm³) sembra associarsi ad una risposta eterogenea [79],[85],[89], rispetto al controllo sano o all'individuo HIV⁺ non immunodeficiente, rispecchiando probabilmente differenze interindividuali relative al grado di recupero immunologico in atto e/o all'efficacia del trattamento.

Nella coorte di PLWH oggetto del presente studio, la reazione anticorpale e cellulare alla vaccinazione è indipendente dal *nadir* della conta assoluta T CD4⁺; perciò, il livello di compromissione immunologica raggiunto in corso di malattia non sembra alterare la capacità del sistema immunitario di attivarsi nei confronti di SARS-CoV-2. In altre parole, anche chi ha subito nel corso della malattia la più severa deplezione di cellule T CD4⁺ circolanti è in grado di rispondere in maniera efficace ad un antigene nuovo, purché abbia ottenuto una

adeguata immuno-ricostituzione. Attualmente i riscontri riguardanti la risposta anticorpale in relazione al *nadir* dei linfociti T CD4⁺ sono in linea con i nostri dati [85],[87],[89],[90],[100].

L'importanza del livello di immuno-ricostituzione raggiunto dopo trattamento antiretrovirale combinato emerge già a partire dalla caratterizzazione della risposta umorale e cellulare in PLWH durante infezione da SARS-CoV-2, dove la risposta T complessiva correla positivamente con il pool di cellule CD4⁺ naïve, il rapporto CD4⁺/CD8⁺ e la severità di malattia; da questo risultato si apprende immediatamente che il ripristino dei difetti quantitativi e funzionali delle cellule T è essenziale per allestire una risposta più efficace contro SARS-CoV-2 [53].

La risposta vaccino-specifica nei partecipanti HIV⁺ in questo studio non correla con il rapporto CD4⁺/CD8⁺, probabilmente perché gran parte dei pazienti si presenta con un rapporto mediano circa pari ad 1, a sua volta segno di una buona immuno-ricostituzione.

È stato riportato che un incremento di 0,5 di tale rapporto è predittivo di risposta umorale e T-mediata più forte in una coorte di PLWH con deficit T CD4⁺ severo (conta < 200 cellule/mm³) [79]. Inoltre, diversi studi effettuati su partecipanti HIV⁺ in buon recupero immunologico (conta media o mediana >500 cellule/mm³) non rilevano differenze significative nelle concentrazioni di anticorpi S-specifici circolanti in base al rapporto CD4⁺/CD8⁺ [85],[89].

I modelli di regressione logistica (non corretti per caratteristiche sociodemografiche e condizioni cliniche) per la risposta immune specifica al vaccino concordano con quanto osservato fino ad ora: né la conta assoluta T CD4⁺ né il relativo *nadir* sono in grado di predire i titoli di anticorpi anti-S prodotti, mentre ogni incremento di 100 cellule/mm³ si associa ad una risposta interferone γ -mediata più pronunciata.

Pertanto, i più bassi valori della conta T CD4⁺ non influenzano l'entità della risposta specifica vaccino-indotta, in quanto la capacità di reagire ad uno stimolo esogeno nuovo dipende dal grado di recupero conseguito dal sistema immunitario dopo inizio della cART.

L'età non sembra avere un ruolo determinante nel modificare l'entità della reazione sia cellulare che umorale al vaccino anti-COVID-19 poiché anche in sottogruppi di età diverse si osservano risposte simili dal punto di vista quantitativo: quindi, tale fattore non si rivela utile nella stima di quanto l'immunità specifica sia in grado di rispondere all'antigene S di SARS-CoV-2, come suggerito anche da altri lavori svolti su PLWH [85],[92],[100].

Questo risultato potrebbe essere spiegato sia dal fatto che gran parte dei partecipanti sono adulti e solo una minoranza ($n=14$ [~12,3%]) ha un'età maggiore od uguale a 65 anni – riconosciuta come possibile fattore di rischio immunologico per malattia severa da SARS-CoV-2 in quanto correlata ad una riduzione del pool di linfociti T CD4⁺ naïve [21] –, sia dall'assenza nel nostro gruppo di comorbidità significative, che incidono negativamente sullo status immunologico (comprese quelle legate all'infezione da HIV). Infatti, *Brumme Z.L.et al.*[87] hanno osservato in soggetti HIV⁺ sotto trattamento antiretrovirale combinato una ridotta risposta umorale e neutralizzante, in relazione all'età e al numero di malattie croniche, in linea con altri studi sui medesimi pazienti [80],[88].

Nei soggetti sani vaccinati l'età è risultata inversamente correlata con l'entità dei titoli di Ig anti-RBD ma non con la produzione di IFN- γ da parte di cellule T Spike-specifiche [58],[61]; in questo *setting* i dati riguardanti l'impatto del fattore anagrafico sulla risposta anticorpale sono discordanti [57],[58],[99],[101].

Infine, il tempo dalla diagnosi di infezione da HIV non modifica gli esiti della risposta specifica vaccino-indotta; ciò appare, nel complesso, in linea con lo scarso impatto del *nadir* della conta dei T CD4⁺ sulla capacità di risposta al vaccino anti SARS-CoV-2, sopra discusso, e sottolinea ulteriormente il ruolo dell'immuno-ricostituzione quale fattore determinante nel predire lo sviluppo di una robusta risposta immunologica virus-specifica.

6. CONCLUSIONI

Nel presente studio, la risposta umorale e T-mediata a vaccinazione contro SARS-CoV-2 in soggetti con infezione da HIV risulta comparabile a quella che si osserva in un gruppo di controllo costituito da soggetti senza evidenza alcuna di immunodeficienza né altra patologia di rilievo.

Il vaccino induce un'attivazione coordinata dei due bracci effettori, umorale e cellulare, verosimilmente coinvolta in una efficiente protezione nei confronti di SARS-CoV-2.

Le concentrazioni di IFN- γ sembrano riflettere l'entità della risposta umorale, poiché ad ogni aumento della stimolazione delle cellule T corrisponde un titolo di anticorpi Spike-specifici più elevato, probabilmente per un'efficace interazione tra linfociti T e B.

I parametri di risposta vaccino-indotta, valutati in maniera trasversale dopo il completamento del ciclo vaccinale primario, decrescono in funzione del tempo trascorso dall'ultima dose di vaccino, rimanendo comunque ben misurabili fino alla settimana/ottava settimana, oltrepassata la quale tendono progressivamente a ridursi, in maniera, peraltro, simile tanto negli individui HIV⁺ quanto nei controlli.

Il fattore temporale riveste, dunque, un ruolo significativo nel predire il declino dei titoli di anticorpi anti-S e della risposta immune T-mediata, misurata mediante produzione di IFN- γ .

L'entità della risposta anticorpale alla vaccinazione anti-COVID-19 non si dimostra connessa con la conta T CD4⁺. Analogamente, non vi è relazione con il *nadir* delle cellule T CD4⁺: gli individui con una storia di immunodeficienza severa (T CD4⁺ <200 cellule/mm³) sono capaci di sviluppare una risposta umorale a vaccino anti-SARS-CoV-2 quantitativamente confrontabile rispetto agli altri soggetti con infezione da HIV.

Al contrario, i livelli attuali di T CD4⁺ appaiono in relazione con le concentrazioni di IFN- γ , mentre l'entità della risposta T-cellulare prescinde dal massimo livello di immuno-deficit T CD4⁺ (*nadir*) raggiunto durante la malattia. Una conta T CD4⁺ recente >500 cellule/mm³ si associa ad una robusta produzione di IFN- γ , paragonabile a quella che si osserva nei controlli, mentre chi presenta un valore assoluto di T CD4⁺ nel *range* 200-500 cellule/mm³ esibisce una risposta cellulare di ampiezza variabile.

Dunque, il numero assoluto di linfociti T CD4⁺ potrebbe rappresentare un fattore predittivo utile a guidare la scelta della somministrazione di una dose *booster* nella popolazione di PLWH, in considerazione di un maggior rischio di esito grave di COVID-19.

Nel presente studio, il rapporto $CD4^+/CD8^+$, indicatore di ricostituzione immunitaria, appare poco rilevante nella stima dei livelli di risposta al vaccino anti-SARS-CoV-2.

Infine, né l'età né il tempo dalla diagnosi di infezione da HIV condizionano lo sviluppo di una risposta umorale e cellulo-mediata alla vaccinazione anti-SARS-CoV-2.

7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. Tesoriero JM, Swain CAE, Pierce JL, Zamboni L, Wu M, Holtgrave DR, et al. COVID-19 Outcomes among Persons Living with or without Diagnosed HIV Infection in New York State. *JAMA Network Open*. 2021;4(2).
2. Geretti AM, Stockdale AJ, Kelly SH, Cevik M, Collins S, Waters L, et al. Outcomes of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Related Hospitalization Among People With Human Immunodeficiency Virus (HIV) in the ISARIC World Health Organization (WHO) Clinical Characterization Protocol (UK): A Prospective Observational Study. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2021;73(7).
3. Del Amo J, Polo R, Moreno S, Jarrín I, Hernán MA. SARS-CoV-2 infection and coronavirus disease 2019 severity in persons with HIV on antiretroviral treatment. *AIDS*. 2022 Feb 1;36(2):161-168. doi: 10.1097/QAD.0000000000003132. PMID: 34934017; PMCID: PMC8824311.
4. Ambrosioni J, Blanco JL, Reyes-Urueña JM, Davies MA, Sued O, Marcos MA, Martínez E, Bertagnolio S, Alcamí J, Miro JM; COVID-19 in HIV Investigators. Overview of SARS-CoV-2 infection in adults living with HIV. *Lancet HIV*. 2021 May;8(5): e294-e305. doi: 10.1016/S2352-3018(21)00070-9. PMID: 33915101; PMCID: PMC8075775.
5. Vidya Vijayan KK, Karthigeyan KP, Tripathi SP, Hanna LE. Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. *Front Immunol*. 2017 May 23; 8:580. doi: 10.3389/fimmu.2017.00580. PMID: 28588579; PMCID: PMC5440548.
6. Okoye AA, Picker LJ. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol Rev*. 2013 Jul;254(1):54-64. doi: 10.1111/imr.12066. PMID: 23772614; PMCID: PMC3729334.
7. Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6:223-48. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130254. PMID: 21034222.
8. Anka AU, Tahir MI, Abubakar SD, Alsabbagh M, Zian Z, Hamedifar H, Sabzevari A, Azizi G. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scand J Immunol*. 2021

- Apr;93(4): e12998. doi: 10.1111/sji.12998. Epub 2020 Dec 3. PMID: 33190302; PMCID: PMC7744910.
9. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, Xie C, Ma K, Shang K, Wang W, Tian DS. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 28;71(15):762-768. doi: 10.1093/cid/ciaa248. PMID: 32161940; PMCID: PMC7108125.
 10. Tan M, Liu Y, Zhou R, Deng X, Li F, Liang K, Shi Y. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology*. 2020 Jul;160(3):261-268. doi: 10.1111/imm.13223. PMID: 32460357; PMCID: PMC7283723.
 11. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, Wang T, Zhang X, Chen H, Yu H, Zhang X, Zhang M, Wu S, Song J, Chen T, Han M, Li S, Luo X, Zhao J, Ning Q. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest*. 2020 May 1;130(5):2620-2629. doi: 10.1172/JCI137244. PMID: 32217835; PMCID: PMC7190990.
 12. Tan L, Wang Q, Zhang D, Ding J, Huang Q, Tang YQ, Wang Q, Miao H. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Mar 27;5(1):33. doi: 10.1038/s41392-020-0148-4. Erratum in: *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Apr 29;5(1):61. PMID: 32296069; PMCID: PMC7100419.
 13. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, Song S, Ma Z, Mo P, Zhang Y. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis*. 2020 May 11;221(11):1762-1769. doi: 10.1093/infdis/jiaa150. PMID: 32227123; PMCID: PMC7184346.
 14. Liu Z, Long W, Tu M, Chen S, Huang Y, Wang S, Zhou W, Chen D, Zhou L, Wang M, Wu M, Huang Q, Xu H, Zeng W, Guo L. Lymphocyte subset (CD4+, CD8+) counts reflect the severity of infection and predict the clinical outcomes in patients with COVID-19. *J Infect*. 2020 Aug;81(2):318-356. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.054. Epub 2020 Apr 11. PMID: 32283159; PMCID: PMC7151318.
 15. Zhang H, Wu T. CD4+T, CD8+T counts and severe COVID-19: A meta-analysis. *J Infect*. 2020 Sep;81(3): e82-e84. doi: 10.1016/j.jinf.2020.06.036. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32569604; PMCID: PMC7305716.

16. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, van de Veen W, Brüggem MC, O'Mahony L, Gao Y, Nadeau K, Akdis CA. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. 2020 Jul;75(7):1564-1581. doi: 10.1111/all.14364. PMID: 32396996; PMCID: PMC7272948.
17. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, Dejnirattisai W, Rostron T, Supasa P, Liu C, López-Camacho C, Slon-Campos J, Zhao Y, Stuart DI, Paesen GC, Grimes JM, Antson AA, Bayfield OW, Hawkins DEDP, Ker DS, Wang B, Turtle L, Subramaniam K, Thomson P, Zhang P, Dold C, Ratcliff J, Simmonds P, de Silva T, Sopp P, Wellington D, Rajapaksa U, Chen YL, Salio M, Napolitani G, Paes W, Borrow P, Kessler BM, Fry JW, Schwabe NF, Semple MG, Baillie JK, Moore SC, Openshaw PJM, Ansari MA, Dunachie S, Barnes E, Frater J, Kerr G, Goulder P, Lockett T, Levin R, Zhang Y, Jing R, Ho LP; Oxford Immunology Network Covid-19 Response T cell Consortium; ISARIC4C Investigators, Cornall RJ, Conlon CP, Klenerman P, Sreaton GR, Mongkolsapaya J, McMichael A, Knight JC, Ogg G, Dong T. Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol*. 2020 Nov;21(11):1336-1345. doi: 10.1038/s41590-020-0782-6. Epub 2020 Sep 4. PMID: 32887977; PMCID: PMC7611020.
18. Triggle CR, Bansal D, Ding H, Islam MM, Farag EABA, Hadi HA, Sultan AA. A Comprehensive Review of Viral Characteristics, Transmission, Pathophysiology, Immune Response, and Management of SARS-CoV-2 and COVID-19 as a Basis for Controlling the Pandemic. *Front Immunol*. 2021 Feb 26; 12:631139. doi: 10.3389/fimmu.2021.631139. PMID: 33717166; PMCID: PMC7952616.
19. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, Rawlings SA, Sutherland A, Premkumar L, Jadi RS, Marrama D, de Silva AM, Frazier A, Carlin AF, Greenbaum JA, Peters B, Krammer F, Smith DM, Crotty S, Sette A. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020 Jun 25;181(7):1489-1501.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015. Epub 2020 May 20. PMID: 32473127; PMCID: PMC7237901.

20. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, Llewellyn-Lacey S, Kamal H, Bogdanovic G, Muschiol S, Wullimann DJ, Kammann T, Emgård J, Parrot T, Folkesson E; Karolinska COVID-19 Study Group, Rooyackers O, Eriksson LI, Henter JI, Sönerborg A, Allander T, Albert J, Nielsen M, Klingström J, Gredmark-Russ S, Björkström NK, Sandberg JK, Price DA, Ljunggren HG, Aleman S, Buggert M. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020 Oct 1;183(1):158-168.e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.017. Epub 2020 Aug 14. PMID: 32979941; PMCID: PMC7427556.
21. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, Belanger S, Abbott RK, Kim C, Choi J, Kato Y, Crotty EG, Kim C, Rawlings SA, Mateus J, Tse LPV, Frazier A, Baric R, Peters B, Greenbaum J, Ollmann Saphire E, Smith DM, Sette A, Crotty S. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020 Nov 12;183(4):996-1012.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.038. Epub 2020 Sep 16. PMID: 33010815; PMCID: PMC7494270.
22. Jamal M, Bangash HI, Habiba M, Lei Y, Xie T, Sun J, Wei Z, Hong Z, Shao L, Zhang Q. Immune dysregulation and system pathology in COVID-19. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):918-936. doi: 10.1080/21505594.2021.1898790. PMID: 33757410; PMCID: PMC7993139.
23. Zheng HY, Zhang M, Yang CX, Zhang N, Wang XC, Yang XP, Dong XQ, Zheng YT. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020 May;17(5):541-543. doi: 10.1038/s41423-020-0401-3. Epub 2020 Mar 17. PMID: 32203186; PMCID: PMC7091621.
24. Sattler A, Angermair S, Stockmann H, Heim KM, Khadzhynov D, Treskatsch S, Halleck F, Kreis ME, Kotsch K. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J Clin Invest*. 2020 Dec 1;130(12):6477-6489. doi: 10.1172/JCI140965. PMID: 32833687; PMCID: PMC7685725.

25. Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6:223-48. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130254. PMID: 21034222.
26. Okoye AA, Picker LJ. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol Rev.* 2013 Jul;254(1):54-64. doi: 10.1111/imr.12066. PMID: 23772614; PMCID: PMC3729334.
27. Le Hingrat Q, Sereti I, Landay AL, Pandrea I, Apetrei C. The Hitchhiker Guide to CD4⁺ T-Cell Depletion in Lentiviral Infection. A Critical Review of the Dynamics of the CD4⁺ T Cells in SIV and HIV Infection. *Front Immunol.* 2021 Jul 21; 12:695674. doi: 10.3389/fimmu.2021.695674. PMID: 34367156; PMCID: PMC8336601.
28. Douek DC, Roederer M, Koup RA. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med.* 2009; 60:471-84. doi: 10.1146/annurev.med.60.041807.123549. PMID: 18947296; PMCID: PMC2716400.
29. Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG, Luther SA. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol.* 2007 Nov;8(11):1255-65. doi: 10.1038/ni1513. Epub 2007 Sep 23. PMID: 17893676.
30. Zeng M, Haase AT, Schacker TW. Lymphoid tissue structure and HIV-1 infection: life or death for T cells. *Trends Immunol.* 2012 Jun;33(6):306-14. doi: 10.1016/j.it.2012.04.002. Epub 2012 May 19. PMID: 22613276.
31. Zeng M, Southern PJ, Reilly CS, Beilman GJ, Chipman JG, Schacker TW, Haase AT. Lymphoid tissue damage in HIV-1 infection depletes naïve T cells and limits T cell reconstitution after antiretroviral therapy. *PLoS Pathog.* 2012 Jan;8(1): e1002437. doi: 10.1371/journal.ppat.1002437. Epub 2012 Jan 5. PMID: 22241988; PMCID: PMC3252371.
32. Zeng M, Smith AJ, Wietgreffe SW, Southern PJ, Schacker TW, Reilly CS, Estes JD, Burton GF, Silvestri G, Lifson JD, Carlis JV, Haase AT. Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. *J Clin Invest.* 2011 Mar;121(3):998-1008. doi: 10.1172/JCI45157. PMID: 21393864; PMCID: PMC3049394.
33. Estes JD, Haase AT, Schacker TW. The role of collagen deposition in depleting CD4⁺ T cells and limiting reconstitution in HIV-1 and SIV infections through damage to the

- secondary lymphoid organ niche. *Semin Immunol.* 2008 Jun;20(3):181-6. doi: 10.1016/j.smim.2008.04.002. Epub 2008 Jul 2. PMID: 18595731; PMCID: PMC2650387.
34. Estes JD. Pathobiology of HIV/SIV-associated changes in secondary lymphoid tissues. *Immunol Rev.* 2013 Jul;254(1):65-77. doi: 10.1111/imr.12070. PMID: 23772615; PMCID: PMC6066369.
 35. Moir S, Malaspina A, Ogwaro KM, Donoghue ET, Hallahan CW, Ehler LA, Liu S, Adelsberger J, Lapointe R, Hwu P, Baseler M, Orenstein JM, Chun TW, Mican JA, Fauci AS. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10362-7. doi: 10.1073/pnas.181347898. Epub 2001 Aug 14. PMID: 11504927; PMCID: PMC56966.
 36. Fenwick C, Joo V, Jacquier P, Noto A, Banga R, Perreau M, Pantaleo G. T-cell exhaustion in HIV infection. *Immunol Rev.* 2019 Nov;292(1):149-163. doi: 10.1111/imr.12823. PMID: 31883174; PMCID: PMC7003858.
 37. Susan Moir, Jason Ho, Angela Malaspina, Wei Wang, Angela C. DiPoto, Marie A. O'Shea, Gregg Roby, Shyam Kottlilil, James Arthos, Michael A. Proschan, Tae-Wook Chun, Anthony S. Fauci; Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* 4 August 2008; 205 (8): 1797–1805. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20072683>
 38. Pau AK, George JM. Antiretroviral therapy: current drugs. *Infect Dis Clin North Am.* 2014 Sep;28(3):371-402. doi: 10.1016/j.idc.2014.06.001. PMID: 25151562; PMCID: PMC4143801.
 39. Plana, Montserrat; García, Felipeb; Gallart, Teresa; Tortajada, Cecilia; Soriano, Alex; Palou, Eduarda; Maleno, María Ja; Barceló, Juan Ja; Vidal, Carmenc; Cruceta, Annab; Miró, José Mb; Gatell, José Mb Immunological benefits of antiretroviral therapy in very early stages of asymptomatic chronic HIV-1 infection, *AIDS.* September 8, 2000. 14 (13):1921-1933.
 40. Klatt NR, Chomont N, Douek DC, Deeks SG. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol Rev.*

- 2013 Jul;254(1):326-42. doi: 10.1111/imr.12065. PMID: 23772629; PMCID: PMC3694608.
41. Moir S, Malaspina A, Ho J, Wang W, Dipoto AC, O'Shea MA, Roby G, Mican JM, Kottlilil S, Chun TW, Proschan MA, Fauci AS. Normalization of B cell counts and subpopulations after antiretroviral therapy in chronic HIV disease. *J Infect Dis*. 2008 Feb 15;197(4):572-9. doi: 10.1086/526789. PMID: 18240953.
 42. Moir S, Buckner CM, Ho J, Wang W, Chen J, Waldner AJ, Posada JG, Kardava L, O'Shea MA, Kottlilil S, Chun TW, Proschan MA, Fauci AS. B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood*. 2010 Dec 16;116(25):5571-9. doi: 10.1182/blood-2010-05-285528. Epub 2010 Sep 13. PMID: 20837780; PMCID: PMC3031405.
 43. Jamal M, Bangash HI, Habiba M, Lei Y, Xie T, Sun J, Wei Z, Hong Z, Shao L, Zhang Q. Immune dysregulation and system pathology in COVID-19. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):918-936. doi: 10.1080/21505594.2021.1898790. PMID: 33757410; PMCID: PMC7993139.
 44. Liu Y, Liao W, Wan L, Xiang T, Zhang W. Correlation Between Relative Nasopharyngeal Virus RNA Load and Lymphocyte Count Disease Severity in Patients with COVID-19. *Viral Immunol*. 2021 Jun;34(5):330-335. doi: 10.1089/vim.2020.0062. Epub 2020 Apr 10. PMID: 32297828.
 45. Zheng HY, Zhang M, Yang CX, Zhang N, Wang XC, Yang XP, Dong XQ, Zheng YT. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020 May;17(5):541-543. doi: 10.1038/s41423-020-0401-3. Epub 2020 Mar 17. PMID: 32203186; PMCID: PMC7091621.
 46. Li M, Guo W, Dong Y, Wang X, Dai D, Liu X, Wu Y, Li M, Zhang W, Zhou H, Zhang Z, Lin L, Kang Z, Yu T, Tian C, Qin R, Gui Y, Jiang F, Fan H, Heissmeyer V, Sarapultsev A, Wang L, Luo S, Hu D. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8⁺ T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. *Front Immunol*. 2020 Oct 14; 11:580237. doi: 10.3389/fimmu.2020.580237. PMID: 33154753; PMCID: PMC7591707.

47. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021 Feb 18;184(4):861-880. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33497610; PMCID: PMC7803150.
48. Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, Czudnochowski N, Walls AC, Beltramello M, Silacci-Fregni C, Pinto D, Rosen LE, Bowen JE, Acton OJ, Jaconi S, Guarino B, Minola A, Zatta F, Sprugasci N, Bassi J, Peter A, De Marco A, Nix JC, Mele F, Jovic S, Rodriguez BF, Gupta SV, Jin F, Piumatti G, Lo Presti G, Pellanda AF, Biggiogero M, Tarkowski M, Pizzuto MS, Cameroni E, Havenar-Daughton C, Smithey M, Hong D, Lepori V, Albanese E, Ceschi A, Bernasconi E, Elzi L, Ferrari P, Garzoni C, Riva A, Snell G, Sallusto F, Fink K, Virgin HW, Lanzavecchia A, Corti D, Velesler D. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*. 2020 Nov 12;183(4):1024-1042.e21. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.037. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32991844; PMCID: PMC7494283.
49. Peng X, Ouyang J, Isnard S, Lin J, Fombuena B, Zhu B, Routy JP. Sharing CD4+ T Cell Loss: When COVID-19 and HIV Collide on Immune System. *Front Immunol*. 2020 Dec 15; 11:596631. doi: 10.3389/fimmu.2020.596631. PMID: 33384690; PMCID: PMC7770166.
50. Sharov KS. HIV/SARS-CoV-2 co-infection: T cell profile, cytokine dynamics and role of exhausted lymphocytes. *Int J Infect Dis*. 2021 Jan; 102:163-169. doi: 10.1016/j.ijid.2020.10.049. Epub 2020 Oct 25. PMID: 33115677; PMCID: PMC7585731.
51. Mondì A, Cimini E, Colavita F, Cicalini S, Pinnetti C, Matusali G, Casetti R, Maeurer M, Vergori A, Mazzotta V, Gagliardini R, De Zottis F, Schinina V, Girardi E, Puro V, Ippolito G, Vaia F, Capobianchi MR, Castilletti C, Agrati C, Antinori A. COVID-19 in people living with HIV: Clinical implications of dynamics of the immune response to SARS-CoV-2. *J Med Virol*. 2021 Mar;93(3):1796-1804. doi: 10.1002/jmv.26556. Epub 2020 Oct 8. PMID: 32975842; PMCID: PMC7537181.
52. Spinelli MA, Lynch KL, Yun C, Glidden DV, Peluso MJ, Henrich TJ, Gandhi M, Brown LB. SARS-CoV-2 seroprevalence, and IgG concentration and pseudovirus neutralising antibody titres after infection, compared by HIV status: a matched case-control observational study. *Lancet HIV*. 2021 Jun;8(6): e334-e341. doi:

- 10.1016/S2352-3018(21)00072-2. Epub 2021 Apr 29. PMID: 33933189; PMCID: PMC8084354.
53. Alrubayyi A, Gea-Mallorquí E, Touizer E, Hameiri-Bowen D, Kopycinski J, Charlton B, Fisher-Pearson N, Muir L, Rosa A, Roustan C, Earl C, Cherepanov P, Pellegrino P, Waters L, Burns F, Kinloch S, Dong T, Dorrell L, Rowland-Jones S, McCoy LE, Peppas D. Characterization of humoral and SARS-CoV-2 specific T cell responses in people living with HIV. *Nat Commun.* 2021 Oct 5;12(1):5839. doi: 10.1038/s41467-021-26137-7. PMID: 34611163; PMCID: PMC8492866.
 54. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 2020; 383:2603–15.
 55. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* 2021; 384:403–16.
 56. Thomas SJ, Moreira ED Jr, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Perez JL, Pérez Marc G, Polack FP, Zerbini C, Bailey R, Swanson KA, Xu X, Roychoudhury S, Koury K, Bouguermouh S, Kalina WV, Cooper D, Frenck RW Jr, Hammitt LL, Türeci Ö, Nell H, Schaefer A, Ünal S, Yang Q, Liberator P, Tresnan DB, Mather S, Dormitzer PR, Şahin U, Gruber WC, Jansen KU; C4591001 Clinical Trial Group. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. *N Engl J Med.* 2021 Nov 4;385(19):1761-1773. doi: 10.1056/NEJMoa2110345. Epub 2021 Sep 15. PMID: 34525277; PMCID: PMC8461570.
 57. Lustig Y, Sapir E, Regev-Yochay G, Cohen C, Fluss R, Olmer L, Indenbaum V, Mandelboim M, Doolman R, Amit S, Mendelson E, Ziv A, Huppert A, Rubin C, Freedman L, Kreiss Y. BNT162b2 COVID-19 vaccine and correlates of humoral immune responses and dynamics: a prospective, single-centre, longitudinal cohort study in health-care workers. *Lancet Respir Med.* 2021 Sep;9(9):999-1009. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00220-4. Epub 2021 Jul 2. PMID: 34224675; PMCID: PMC8253545.
 58. Almendro-Vázquez P, Laguna-Goya R, Ruiz-Ruigomez M, Utrero-Rico A, Lalueza A, Maestro de la Calle G, Delgado P, Perez-Ordoño L, Muro E, Vila J, Zamarron I, Moreno-Batanero M, Chivite-Lacaba M, Gil-Etayo FJ, Martín-Higuera C, Meléndez-Carmona MÁ, Lumbreras C, Arellano I, Alarcon B, Allende LM, Aguado JM, Paz-Artal E. Longitudinal dynamics of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral

- immunity after natural infection or BNT162b2 vaccination. *PLoS Pathog.* 2021 Dec 28;17(12): e1010211. doi: 10.1371/journal.ppat.1010211. PMID: 34962970; PMCID: PMC8757952.
59. Schwarzkopf S, Krawczyk A, Knop D, Klump H, Heinold A, Heinemann FM, Thümmeler L, Temme C, Breyer M, Witzke O, Dittmer U, Lenz V, Horn PA, Lindemann M. Cellular Immunity in COVID-19 Convalescents with PCR-Confirmed Infection but with Undetectable SARS-CoV-2-Specific IgG. *Emerg Infect Dis.* 2021 Jan;27(1). doi: 10.3201/2701.203772. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33058753.
 60. Sahin, U., Muik, A., Derhovanessian, E. *et al.* COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and T_H1 T cell responses. *Nature* 586, 594–599 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2814-7>
 61. Agrati C, Castilletti C, Goletti D, Meschi S, Sacchi A, Matusali G, Bordoni V, Petrone L, Lapa D, Notari S, Vanini V, Colavita F, Aiello A, Agresta A, Farroni C, Grassi G, Leone S, Vaia F, Capobianchi MR, Ippolito G, Puro V, On Behalf Of The Inmi Covid-Vaccine Study Group. Coordinate Induction of Humoral and Spike Specific T-Cell Response in a Cohort of Italian Health Care Workers Receiving BNT162b2 mRNA Vaccine. *Microorganisms.* 2021 Jun 16;9(6):1315. doi: 10.3390/microorganisms9061315. PMID: 34208751; PMCID: PMC8235087.
 62. Ramasamy MN, Minassian AM, Ewer KJ, Flaxman AL, Folegatti PM, Owens DR, Voysey M, Aley PK, Angus B, Babbage G, Belij-Rammerstorfer S, Berry L, Bibi S, Bittaye M, Cathie K, Chappell H, Charlton S, Cicconi P, Clutterbuck EA, Colin-Jones R, Dold C, Emary KRW, Fedosyuk S, Fuskova M, Gbesemete D, Green C, Hallis B, Hou MM, Jenkin D, Joe CCD, Kelly EJ, Kerridge S, Lawrie AM, Lelliott A, Lwin MN, Makinson R, Marchevsky NG, Mujadidi Y, Munro APS, Pacurar M, Plested E, Rand J, Rawlinson T, Rhead S, Robinson H, Ritchie AJ, Ross-Russell AL, Saich S, Singh N, Smith CC, Snape MD, Song R, Tarrant R, Themistocleous Y, Thomas KM, Villafana TL, Warren SC, Watson MEE, Douglas AD, Hill AVS, Lambe T, Gilbert SC, Faust SN, Pollard AJ; Oxford COVID Vaccine Trial Group. Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. *Lancet.* 2021 Dec 19;396(10267):1979-1993. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32466-1. Epub 2020 Nov 19. Erratum in: *Lancet.* 2021 Dec

- 19;396(10267):1978. Erratum in: *Lancet*. 2021 Apr 10;397(10282):1350. PMID: 33220855; PMCID: PMC7674972.
63. Voysey M, Costa Clemens SA, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, Angus B, Baillie VL, Barnabas SL, Bhorat QE, Bibi S, Briner C, Cicconi P, Clutterbuck EA, Collins AM, Cutland CL, Darton TC, Dheda K, Dold C, Duncan CJA, Emary KRW, Ewer KJ, Flaxman A, Fairlie L, Faust SN, Feng S, Ferreira DM, Finn A, Galiza E, Goodman AL, Green CM, Green CA, Greenland M, Hill C, Hill HC, Hirsch I, Izu A, Jenkin D, Joe CCD, Kerridge S, Koen A, Kwatra G, Lazarus R, Libri V, Lillie PJ, Marchevsky NG, Marshall RP, Mendes AVA, Milan EP, Minassian AM, McGregor A, Mujadidi YF, Nana A, Padayachee SD, Phillips DJ, Pittella A, Plested E, Pollock KM, Ramasamy MN, Ritchie AJ, Robinson H, Schwarzbald AV, Smith A, Song R, Snape MD, Sprinz E, Sutherland RK, Thomson EC, Török ME, Toshner M, Turner DPJ, Vekemans J, Villafana TL, White T, Williams CJ, Douglas AD, Hill AVS, Lambe T, Gilbert SC, Pollard AJ; Oxford COVID Vaccine Trial Group. Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials. *Lancet*. 2021 Mar 6;397(10277):881-891. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00432-3. Epub 2021 Feb 19. Erratum in: *Lancet*. 2021 Mar 6;397(10277):880. PMID: 33617777; PMCID: PMC7894131.
64. Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cárdenas V, Shukarev G, Grinsztejn B, Goepfert PA, Truyers C, Fennema H, Spiessens B, Offergeld K, Scheper G, Taylor KL, Robb ML, Treanor J, Barouch DH, Stoddard J, Ryser MF, Marovich MA, Neuzil KM, Corey L, Cauwenberghs N, Tanner T, Hardt K, Ruiz-Guiñazú J, Le Gars M, Schuitemaker H, Van Hoof J, Struyf F, Douoguih M; ENSEMBLE Study Group. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med*. 2021 Jun 10;384(23):2187-2201. doi: 10.1056/NEJMoa2101544. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33882225; PMCID: PMC8220996.
65. Stephenson KE, Le Gars M, Sadoff J, de Groot AM, Heerwegh D, Truyers C, Atyeo C, Loos C, Chandrashekar A, McMahan K, Tostanoski LH, Yu J, Gebre MS, Jacob-Dolan C, Li Z, Patel S, Peter L, Liu J, Borducchi EN, Nkolola JP, Souza M, Tan CS, Zash R, Julg B, Nathavitharana RR, Shapiro RL, Azim AA, Alonso CD, Jaegle K, Ansel JL, Kanjilal DG, Guiney CJ, Bradshaw C, Tyler A, Makoni T, Yanosick KE,

- Seaman MS, Lauffenburger DA, Alter G, Struyf F, Douoguih M, Van Hoof J, Schuitemaker H, Barouch DH. Immunogenicity of the Ad26.COV2.S Vaccine for COVID-19. *JAMA*. 2021 Apr 20;325(15):1535-1544. doi: 10.1001/jama.2021.3645. PMID: 33704352; PMCID: PMC7953339.
66. Kaufmann GR, Zaunders J, Cooper DA. Immune reconstitution in HIV-1 infected subjects treated with potent antiretroviral therapy. *Sex Transm Infect*. 1999 Aug;75(4):218-24. doi: 10.1136/sti.75.4.218. PMID: 10615305; PMCID: PMC1758216.
67. Kaufmann GR, Zaunders JJ, Cunningham P, Kelleher AD, Grey P, Smith D, Carr A, Cooper DA. Rapid restoration of CD4 T cell subsets in subjects receiving antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection. *AIDS*. 2000 Dec 1;14(17):2643-51. doi: 10.1097/00002030-200012010-00003. PMID: 11125882.
68. Dyrhol-Riise AM, Voltersvik P, Røsok BI, Olofsson J, Asjö B. Normalization of CD4+ cell numbers and reduced levels of memory CD8+ cells in blood and tonsillar tissue after highly active antiretroviral therapy in early HIV type-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000 Feb 10;16(3):191-201. doi: 10.1089/088922200309287. PMID: 10710207.
69. Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M, Kotzin BL, Fox L, Chiozzi MH, Leonard JM, Rousseau F, Wade M, Roe JD, Martinez A, Kessler H. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis*. 1998 Jul;178(1):70-9. doi: 10.1086/515591. PMID: 9652425.
70. Plana M, Martínez C, García F, Maleno MJ, Barceló JJ, García A, Lejeune M, Vidal C, Cruceta A, Miró JM, Pumarola T, Gallart T, Gatell JM. Immunologic reconstitution after 1 year of highly active antiretroviral therapy, with or without protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 Apr 15;29(5):429-34. doi: 10.1097/00126334-200204150-00001. PMID: 11981357.
71. Li TS, Tubiana R, Katlama C, Calvez V, Ait Mohand H, Autran B. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet*. 1998 Jun 6;351(9117):1682-6. doi: 10.1016/s0140-6736(97)10291-4. PMID: 9734884.

72. Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debré P, Leibowitch J. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science*. 1997 Jul 4;277(5322):112-6. doi: 10.1126/science.277.5322.112. PMID: 9204894.
73. Valdez H, et al. Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. *AIDS*. 2002; 16:1859–1866
74. Aiuti F, Mezzaroma I. Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART. *AIDS Rev*. 2006 Apr-Jun;8(2):88-97. PMID: 16848276.
75. Kelley CF, Kitchen CM, Hunt PW, Rodriguez B, Hecht FM, Kitahata M, Crane HM, Willig J, Mugavero M, Saag M, Martin JN, Deeks SG. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. *Clin Infect Dis*. 2009 Mar 15;48(6):787-94. doi: 10.1086/597093. PMID: 19193107; PMCID: PMC2720023.
76. Touizer E, Alrubayyi A, Rees-Spear C, Fisher-Pearson N, Griffith SA, Muir L, Pellegrino P, Waters L, Burns F, Kinloch S, Rowland-Jones S, Gupta RK, Gilson R, Peppia D, McCoy LE. Failure to seroconvert after two doses of BNT162b2 SARS-CoV-2 vaccine in a patient with uncontrolled HIV. *Lancet HIV*. 2021 Jun;8(6): e317-e318. doi: 10.1016/S2352-3018(21)00099-0. PMID: 34087093; PMCID: PMC8169058.
77. Spinelli MA, Peluso MJ, Lynch KL, Yun C, Glidden DV, Henrich TJ, Deeks SG, Gandhi M. Differences in Post-mRNA Vaccination SARS-CoV-2 IgG Concentrations and Surrogate Virus Neutralization Test Response by HIV Status and Type of Vaccine: a Matched Case-Control Observational Study. *Clin Infect Dis*. 2021 Dec 5: ciab1009. doi: 10.1093/cid/ciab1009. Epub ahead of print. PMID: 34864962; PMCID: PMC8689738.
78. Liu Y, Han J, Li X, Chen D, Zhao X, Qiu Y, Zhang L, Xiao J, Li B, Zhao H. COVID-19 Vaccination in People Living with HIV (PLWH) in China: A Cross Sectional Study of Vaccine Hesitancy, Safety, and Immunogenicity. *Vaccines (Basel)*. 2021 Dec 9;9(12):1458. doi: 10.3390/vaccines9121458. PMID: 34960204; PMCID: PMC8706383.

79. Antinori A. et al. Humoral and Cellular Immune Response Elicited by mRNA Vaccination Against SARS-CoV-2 in People Living with HIV (PLWH) Receiving Antiretroviral Therapy (ART) According with Current CD4 T-Lymphocyte Count. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3929972> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3929972> [Preprint]
80. Lauriane Nault, Lorie Marchitto, Guillaume Goyette, Daniel Tremblay-Sher, Claude Fortin, Valérie Martel-Laferrière, Benoît Trottier, Jonathan Richard, Madeleine Durand, Daniel Kaufmann, Andrés Finzi, Cécile Tremblay. Covid-19 vaccine immunogenicity in people living with HIV-1. *bioRxiv* [Preprint]. 2021.08.13.456258; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.08.13.456258>
81. Erna Milunka Kojic, Minhee Kang, Michelle S. Cespedes, Triin Umbleja, Catherine Godfrey, Reena T. Allen, Cynthia Firnhaber, Beatriz Grinsztejn, Joel M. Palefsky, Jennifer Y. Webster-Cyriaque, Alfred Saah, Judith A. Aberg, Susan Cu-Uvin, Immunogenicity and Safety of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine in HIV-1–Infected Women, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 59, Issue 1, 1 July 2014, Pages 127–135, <https://doi.org/10.1093/cid/ciu238>
82. Nurith Vardinon, Rachel Handsher, Michael Burke, Vera Zacut, Israel Yust, Poliovirus Vaccination Responses in HIV-Infected Patients: Correlation with T4 Cell Counts, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 162, Issue 1, July 1990, Pages 238–241, <https://doi.org/10.1093/infdis/162.1.238>
83. Kroon FP, Rimmelzwaan GF, Roos MT, Osterhaus AD, Hamann D, Miedema F, van Dissel JT. Restored humoral immune response to influenza vaccination in HIV-infected adults treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 1998 Dec 3;12(17): F217-23. doi: 10.1097/00002030-199817000-00002. PMID: 9863863.
84. El Chaer F, El Sahly HM. Vaccination in the adult patient infected with HIV: a review of vaccine efficacy and immunogenicity. *Am J Med*. 2019; 132:437–46. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.12.011>
85. Lombardi A, Butta GM, Donnici L, Bozzi G, Oggioni M, Bono P, Matera M, Consonni D, Ludovisi S, Muscatello A, Ceriotti F, Conti M, Scaglioni S, Gallo G, Scarpa E, Letko M, Abrignani S, Grifantini R, De Francesco R, Gori A, Manganaro L, Bandera A. Anti-spike antibodies and neutralising antibody activity in people living with HIV vaccinated with COVID-19 mRNA-1273 vaccine: a prospective

- single-centre cohort study. *Lancet Reg Health Eur.* 2021 Dec 23:100287. doi: 10.1016/j.lanepe.2021.100287. Epub ahead of print. PMID: 34961855; PMCID: PMC8694797.
86. Woldemeskel BA, Karaba AH, Garliss CC, Beck EJ, Wang KH, Laeyendecker O, Cox AL, Blankson JN. The BNT162b2 mRNA Vaccine Elicits Robust Humoral and Cellular Immune Responses in People Living with HIV. *Clin Infect Dis.* 2021 Jul 22: ciab648. doi: 10.1093/cid/ciab648. Epub ahead of print. PMID: 34293114; PMCID: PMC8406881.
87. Brumme ZL, Mwimanzi F, Lapointe HR, Cheung P, Sang Y, Duncan MC, Yaseen F, Agafitei O, Ennis S, Ng K, Basra S, Lim LY, Kalikawe R, Speckmaier S, Moran-Garcia N, Young L, Ali H, Ganase B, Umvilighozo G, Omondi FH, Atkinson K, Sudderuddin H, Toy J, Sereda P, Burns L, Costiniuk CT, Cooper C, Anis AH, Leung V, Holmes D, DeMarco ML, Simons J, Hedgcock M, Romney MG, Barrios R, Guillemi S, Brumme CJ, Pantophlet R, Montaner JSG, Niikura M, Harris M, Hull M, Brockman MA. Humoral immune responses to COVID-19 vaccination in people living with HIV receiving suppressive antiretroviral therapy. *medRxiv [Preprint]*. 2021 Oct 15:2021.10.03.21264320. doi: 10.1101/2021.10.03.21264320. PMID: 34671779; PMCID: PMC8528088.
88. Levy I, Wieder-Finesod A, Litchevsky V, Biber A, Indenbaum V, Olmer L, Huppert A, Mor O, Goldstein M, Levin EG, Hod T, Cohen C, Lustig Y, Rahav G. Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in people living with HIV-1. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Dec;27(12):1851-1855. doi: 10.1016/j.cmi.2021.07.031. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34438069; PMCID: PMC8382485.
89. Jedicke N, Stankov MV, Cossmann A, Dopfer-Jablonka A, Knuth C, Ahrenstorf G, Ramos GM, Behrens GMN. Humoral immune response following prime and boost BNT162b2 vaccination in people living with HIV on antiretroviral therapy. *HIV Med.* 2021 Nov 2:10.1111/hiv.13202. doi: 10.1111/hiv.13202. Epub ahead of print. PMID: 34725907; PMCID: PMC8652991.
90. Heftdal, LD, Knudsen, AD, Hamm, SR, Hansen, CB, Møller, DL, Pries-Heje, M, et al. Humoral response to two doses of BNT162b2 vaccination in people with HIV. *J Intern Med.* 2021; 00 1– 6. <https://doi.org/10.1111/joim.13419>

91. Aledo MG, Cañizares A, Vázquez-Rodríguez P, Castro Á, Moldes L, López S, Míguez E, Bou G, Mena Á. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 and BNT162b2 vaccines in people living with HIV. *AIDS*. 2022 Jan 6. doi: 10.1097/QAD.0000000000003161. Epub ahead of print. PMID: 34999608.
92. Frater J, Ewer KJ, Ogbe A, Pace M, Adele S, Adland E, Alagaratnam J, Aley PK, Ali M, Ansari MA, Bara A, Bittaye M, Broadhead S, Brown A, Brown H, Cappuccini F, Cooney E, Dejnirattisai W, Dold C, Fairhead C, Fok H, Folegatti PM, Fowler J, Gibbs C, Goodman AL, Jenkin D, Jones M, Makinson R, Marchevsky NG, Mujadidi YF, Nguyen H, Parolini L, Petersen C, Plested E, Pollock KM, Ramasamy MN, Rhead S, Robinson H, Robinson N, Rongkard P, Ryan F, Serrano S, Tipoe T, Voysey M, Waters A, Zacharopoulou P, Barnes E, Dunachie S, Goulder P, Klenerman P, Screaton GR, Winston A, Hill AVS, Gilbert SC, Pollard AJ, Fidler S, Fox J, Lambe T; Oxford COVID Vaccine Trial Group. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 in HIV infection: a single-arm substudy of a phase 2/3 clinical trial. *Lancet HIV*. 2021 Aug;8(8): e474-e485. doi: 10.1016/S2352-3018(21)00103-X. Epub 2021 Jun 18. PMID: 34153264; PMCID: PMC8213361.
93. Feng Y, Zhang Y, He Z, Huang H, Tian X, Wang G, Chen D, Ren Y, Jia L, Wang W, Wu J, Shao L, Zhang W, Tang H, Wan Y. Immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in people living with HIV-1: a non-randomized cohort study. *EClinicalMedicine*. 2022 Jan; 43:101226. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101226. Epub 2021 Dec 4. PMID: 34901799; PMCID: PMC8642727.
94. Widge AT, Roupael NG, Jackson LA, Anderson EJ, Roberts PC, Makhene M, Chappell JD, Denison MR, Stevens LJ, Pruijssers AJ, McDermott AB, Flach B, Lin BC, Doria-Rose NA, O'Dell S, Schmidt SD, Neuzil KM, Bennett H, Leav B, Makowski M, Albert J, Cross K, Edara VV, Floyd K, Suthar MS, Buchanan W, Luke CJ, Ledgerwood JE, Mascola JR, Graham BS, Beigel JH; mRNA-1273 Study Group. Durability of Responses after SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccination. *N Engl J Med*. 2021 Jan 7;384(1):80-82. doi: 10.1056/NEJMc2032195. Epub 2020 Dec 3. PMID: 33270381; PMCID: PMC7727324.
95. Sahin U, Muik A, Vogler I, Derhovanessian E, Kranz LM, Vormehr M, Quandt J, Bidmon N, Ulges A, Baum A, Pascal KE, Maurus D, Brachtendorf S, Lörks V,

- Sikorski J, Koch P, Hilker R, Becker D, Eller AK, Grützner J, Tonigold M, Boesler C, Rosenbaum C, Heesen L, Kühnle MC, Poran A, Dong JZ, Luxemburger U, Kemmer-Brück A, Langer D, Bexon M, Bolte S, Palanche T, Schultz A, Baumann S, Mahiny AJ, Boros G, Reinholz J, Szabó GT, Karikó K, Shi PY, Fontes-Garfias C, Perez JL, Cutler M, Cooper D, Kyratsous CA, Dormitzer PR, Jansen KU, Türeci Ö. BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. *Nature*. 2021 Jul;595(7868):572-577. doi: 10.1038/s41586-021-03653-6. Epub 2021 May 27. PMID: 34044428.
96. Painter MM, Mathew D, Goel RR, Apostolidis SA, Pattekar A, Kuthuru O, Baxter AE, Herati RS, Oldridge DA, Gouma S, Hicks P, Dysinger S, Lundgreen KA, Kuri-Cervantes L, Adamski S, Hicks A, Korte S, Giles JR, Weirick ME, McAllister CM, Dougherty J, Long S, D'Andrea K, Hamilton JT, Betts MR, Bates P, Hensley SE, Grifoni A, Weiskopf D, Sette A, Greenplate AR, Wherry EJ. Rapid induction of antigen-specific CD4⁺ T cells is associated with coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Immunity*. 2021 Sep 14;54(9):2133-2142.e3. doi: 10.1016/j.immuni.2021.08.001. Epub 2021 Aug 13. PMID: 34453880; PMCID: PMC8361141.
97. Kalimuddin S, Tham CYL, Qui M, de Alwis R, Sim JXY, Lim JME, Tan HC, Syenina A, Zhang SL, Le Bert N, Tan AT, Leong YS, Yee JX, Ong EZ, Ooi EE, Bertoletti A, Low JG. Early T cell and binding antibody responses are associated with COVID-19 RNA vaccine efficacy onset. *Med (N Y)*. 2021 Jun 11;2(6):682-688.e4. doi: 10.1016/j.medj.2021.04.003. Epub 2021 Apr 8. PMID: 33851143; PMCID: PMC8030737.
98. Oberhardt V, Luxenburger H, Kemming J, Schulien I, Ciminski K, Giese S, Csernalabics B, Lang-Meli J, Janowska I, Staniek J, Wild K, Basho K, Marinescu MS, Fuchs J, Topfstedt F, Janda A, Sogukpinar O, Hilger H, Stete K, Emmerich F, Bengsch B, Waller CF, Rieg S, Sagar, Boettler T, Zoldan K, Kochs G, Schwemmler M, Rizzi M, Thimme R, Neumann-Haefelin C, Hofmann M. Rapid and stable mobilization of CD8⁺ T cells by SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *Nature*. 2021 Sep;597(7875):268-273. doi: 10.1038/s41586-021-03841-4. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34320609; PMCID: PMC8426185.

99. Goel RR, Apostolidis SA, Painter MM, Mathew D, Pattekar A, Kuthuru O, Gouma S, Hicks P, Meng W, Rosenfeld AM, Dysinger S, Lundgreen KA, Kuri-Cervantes L, Adamski S, Hicks A, Korte S, Oldridge DA, Baxter AE, Giles JR, Weirick ME, McAllister CM, Dougherty J, Long S, D'Andrea K, Hamilton JT, Betts MR, Luning Prak ET, Bates P, Hensley SE, Greenplate AR, Wherry EJ. Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals following mRNA vaccination. *Sci Immunol*. 2021 Apr 15;6(58): eabi6950. doi: 10.1126/sciimmunol.abi6950. PMID: 33858945; PMCID: PMC8158969.
100. Noe S, Ochana N, Wiese C, Schabaz F, Von Krosigk A, Heldwein S, Rasshofer R, Wolf E, Jonsson-Oldenbuettel C. Humoral response to SARS-CoV-2 vaccines in people living with HIV. *Infection*. 2021 Oct 25:1–7. doi: 10.1007/s15010-021-01721-7. Epub ahead of print. PMID: 34694595; PMCID: PMC8543429.
101. Abu Jabal K, Ben-Amram H, Beiruti K, Batheesh Y, Sussan C, Zarka S, Edelstein M. Impact of age, ethnicity, sex and prior infection status on immunogenicity following a single dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: real-world evidence from healthcare workers, Israel, December 2020 to January 2021. *Euro Surveill*. 2021 Feb;26(6):2100096. doi: 10.2807/1560-7917. ES.2021.26.6.2100096. PMID: 33573712; PMCID: PMC7879501.
102. Vergori A. et al. Immunogenicity and reactogenicity to COVID-19 mRNA vaccine additional dose in PLWH. CROI. 2022 Feb 11-16 (18). Abstract. Available from: <http://www.croiconference.org/abstract/>
103. Abid MB, Rubin M, Ledebor N, Szabo A, Longo W, Mohan M, Shah NN, Fenske TS, Abedin S, Runaas L, D'Souza A, Chhabra S, Dhakal B, Hamadani M. Efficacy of a third SARS-CoV-2 mRNA vaccine dose among hematopoietic cell transplantation, CAR T cell, and BiTE recipients. *Cancer Cell*. 2022 Feb 23: S1535-6108(22)00062-9. doi: 10.1016/j.ccell.2022.02.010. Epub ahead of print. PMID: 35202585; PMCID: PMC8864440.
104. Ehmsen S, Asmussen A, Jeppesen SS, Nilsson AC, Østerlev S, Kragh A, Frederiksen H, Ditzel HJ. Antibody responses following third mRNA COVID-19 vaccination in patients with cancer and potential timing of a fourth vaccination. *Cancer Cell*. 2022 Feb 24: S1535-6108(22)00063-0. doi: 10.1016/j.ccell.2022.02.011. Epub ahead of print. PMID: 35216675; PMCID: PMC8867110.

105. Avivi I, Luttwak E, Saiag E, Halperin T, Haberman S, Sarig A, Levi S, Aharon A, Herishanu Y, Perry C. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine booster induces seroconversion in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma who failed to respond to two prior vaccine doses. *Br J Haematol.* 2022 Jan 25. doi: 10.1111/bjh.18029. Epub ahead of print. PMID: 35075635.