

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Istituto di Malattie Infettive e Tropicali

XXIII Ciclo Dottorato di Ricerca in

MALATTIE INFETTIVE



**EPIDEMIOLOGIA E FILODINAMICA DEI GENOTIPI
E SOTTOGENOTIPI DI HBV PIÙ DIFFUSI
IN ITALIA E IN ALBANIA**

Coordinatore: Prof. Massimo GALLI

Tutor: Dr. Gianguglielmo ZEHENDER

Tesi di Dottorato di Ricerca

Dott.ssa Renata SHKJEZI

Matr. n. R07636

Anno Accademico 2009 - 2010

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Istituto di Malattie Infettive e Tropicali

XXIII Ciclo Dottorato di Ricerca in

MALATTIE INFETTIVE

**EPIDEMIOLOGIA E FILODINAMICA DEI GENOTIPI
E SOTTOGENOTIPI DI HBV PIÙ DIFFUSI
IN ITALIA E IN ALBANIA**

Coordinatore: Prof. Massimo Galli

Tutor: Dr. Gianguglielmo Zehender

Tesi di Dottorato di Ricerca

Dott.ssa Renata SHKJEZI

Matricola R07636

La tesi è stata svolta presso il laboratorio della Cattedra di Malattie Infettive,
Ospedale “Luigi Sacco”, Milano, Italia

a mio marito e mia figlia

INDICE

Ringraziamenti	pag. 6
Falënderime	» 7
Introduzione	» 8
Struttura del virus	» 8
Genoma virale	» 10
- Regione pre-S/S	» 11
- Regione pre-C/C	» 13
- Gene Pol	» 14
- Gene X	» 15
Ciclo replicativo	» 16
Patogenesi	» 19
Epidemiologia e modalità di trasmissione	» 24
Sottotipi	» 28
Genotipi e sottogenotipi	» 28
Mutanti di HBV	» 33
- Mutanti della regione pre-C/C	» 35
- Mutanti della regione pre-S/S	» 36
- Mutanti del dene della polimerasi	» 38
- Mutanti del gene X	» 40
Genotipi ricombinanti	» 40
Implicazioni cliniche dei fenotipi e genotipi di HBV	» 43
Coinfezione HBV-HIV	» 44
Infezione da HBV in Albania	» 47
Materiali e metodi	» 52
Popolazione in studio	» 52

- Soggetti albanesi	»	52
- Soggetti italiani	»	53
- Data set	»	54
Metodi	»	55
- Modalità di raccolta, preparazione e conservazione dei campioni	»	55
- Estrazione del DNA	»	55
- Amplificazione del DNA virale in regione pre-S/S e P mediante nested-PCR	»	57
- Rilevamento dei prodotti di PCR	»	60
- Purificazione dei prodotti di PCR	»	62
- Reazione di sequenza	»	62
Miscela di reazione e cicli di sequenziamento	»	63
Purificazione dei prodotti di sequenza	»	64
Sequenziamento	»	64
Analisi dei dati di sequenza	»	65
- Analisi filogenetica	»	65
- Analisi dei ricombinanti con Simplot	»	68
- Analisi statistica	»	68
- Analisi filodinamica	»	69
Risultati	»	73
Analisi filogenetica delle sequenze albanesi	»	73
Analisi filogenetica delle sequenze italiane	»	77
Stima dell'evolutionary rate	»	83
Analisi filodinamica	»	88
Discussione	»	92
Bibliografia	»	98

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzi tutto ringraziare il Dott. Giangulielmo Zehender, tutor di questa tesi, per i preziosi insegnamenti durante il corso di dottorato, per la grande disponibilità e cortesia.

Inoltre, ringrazio il Prof. Massimo Galli, coordinatore della tesi, per il grande appoggio e comprensione.

Un grazie di cuore al gruppo scientifico del laboratorio che mi ha dato tanto sia dal punto di vista umano che tecnico. Un grazie alle Dott.sse Erika, Chiara, Flavia, Alessia, Michela, Elena e anche a Dott. Salvatore Sollima per l'aiuto e le risposte a tutte le mie domande, senza i quali la tesi non avrebbe prodotto i risultati attesi.

Ringrazio l'Istituto della Sanità Pubblica di Tirana, Albania e in particolare per la disponibilità la Prof.ssa Asc. Silva Bino, la Dott.ssa Mimoza Basho, il Dott. Shpëtim Qyra, il Dott. Roland Bani ed anche le Dott.sse Zhani Abazi e Bora Kaziu del Centro Nazionale della Trasfusione di Sangue, Tirana, Albania per avermi fornito il materiale e dati indispensabili per la realizzazione della tesi.

Vorrei esprimere la mia sincera gratitudine al Prof. Dhimitër Kraja, Primario del Dipartimento di Malattie Infettive, Centro Ospedaliero Universitario "Madre Teresa", Tirana, Albania per le sue idee e consigli utili da quali ha preso spunto questa tesi.

FALËNDERIME

Së pari, dua të falënderoj Dr. Giangulielmo Zehender, tutor i këtij punimi shkencor, për udhëzimet e çmuara, gatishmërinë dhe mirësjelljen e treguar.

Gjithashtu, falënderoj Prof. Massimo Galli, koordinator i këtij punimi, për mirëkuptimin dhe mbështetjen e treguar.

Një falënderim nga zemra për grupin shkencor të laboratorit të Katedrës së Sëmundjeve Infektive, Spitali “Luigi Sacco”, Milano, Itali i cili më ka dhënë shumë, si nga ana njerëzore ashtu edhe nga ajo teknike. Falënderoj doktorëshat Erika, Chiara, Flavia, Alessia, Michela, Elena dhe gjithashtu, Dr. Salvatore Sollima për ndihmën dhe përgjigjet ndaj të gjitha pyetjeve të mia, pa të cilat ky punim nuk do të kishte rezultatet e arritura.

Falënderoj Institutin e Shëndetit Publik, Tiranë, Shqipëri dhe në veçanti për gatishmërinë e treguar Prof. Asoc. Silva Bino, Dr. Mimoza Basho, Dr. Shpëtim Qyra, Dr. Roland Bani dhe doktorëshat Zhani Abazi e Bora Kaziu të Qendrës Kombëtare të Transfuzionit të Gjakut, Tiranë, Shqipëri për grumbullimin e materialeve e të dhënave të nevojshme për realizimin e këtij punimi.

Dua të shpreh mirënjohjen time për Prof. Dhimitër Kraja, Shef i Departamentit të Sëmundjeve Infektive, Qendra Spitalore Universitare “Nënë Tereza”, Tiranë, Shqipëri për idetë dhe këshillat e tij të dobishme nga të cilat mori udhë ky punim shkencor.

INTRODUZIONE

STRUTTURA DEL VIRUS

Il virus dell'epatite (HBV) è un hepadnavirus, finora mai propagato in colture cellulari in vitro.

Il virus completo (virione o particella di Dane) ha un diametro di 42 nm costituito da una parte centrale, *core*, di 27 nm e da un rivestimento, *envelope*, di 7 nm.

Il *core* o *nucleocapside* è composto da due proteine: l'*antigene del core* (HBcAg) e l'*antigene e* (HBeAg), i quali circondano il genoma. Il genoma virale consiste in una molecola di DNA circolare parzialmente a doppia elica, una DNA polimerasi, responsabile della sintesi di DNA virale nelle cellule infettate, ed una proteina kinasi.

L'*envelope* è un doppio strato fosfolipidico che contiene tre proteine, la proteina grande, media e piccola, le quali costituiscono i tre antigeni virali di superficie. La proteina piccola è conosciuta anche come l'antigene Australia (Figura 1).

Il *core* è sintetizzato nel nucleo degli epatociti mentre l'*envelope* è sintetizzato nel citoplasma degli epatociti infetti^{56, 76}.

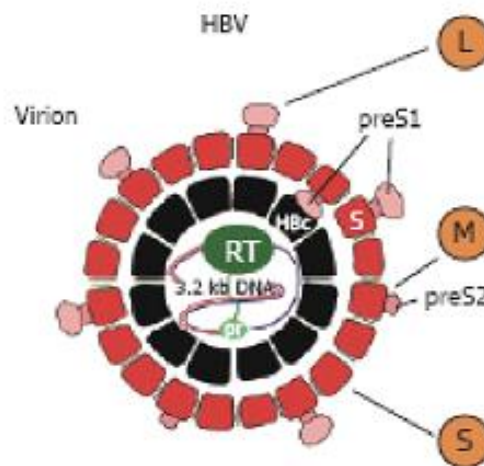


Figura 1. Struttura del virus dell'epatite B.

Nella circolazione sanguigna si osservano anche le particelle subvirali che hanno forma sferica o filamentosa, con un diametro di 20-22 nm e con una lunghezza variabile per i filamenti dai 40-400 nm (Figura 2). Sono formati per auto-assemblaggio delle proteine virali nel lumen del reticolo endoplasmatico e apparato di Golgi, creando delle vescicole che vengono rilasciate dalla cellula infetta ⁷². Le particelle subvirali contengono solo l'envelope insieme agli antigeni virali di superficie. Non sono infettanti perchè sono prive dall'acido nucleico; solo il virus completo è infettante ⁷⁶. Esistono particelle subvirali che contengono solo la proteina S; mentre, i filamenti formati nel reticolo endoplasmatico solo da proteina L non vengono immagazzinate in vescicole e rilasciati nella circolazione sanguigna, ma rimangono all'interno delle cellule ⁷³. Il rapporto tra particelle subvirali e virus completo nel siero dei pazienti affetti dall'epatite B varia da 1000:1 a 10,000:1 ⁷¹. Il ruolo delle particelle subvirali nel ciclo vitale di virus dell'epatite B non è chiaro. Queste particelle possono interagire con il sistema immune dell'ospite oppure favorire il processo infettivo ⁷⁰.

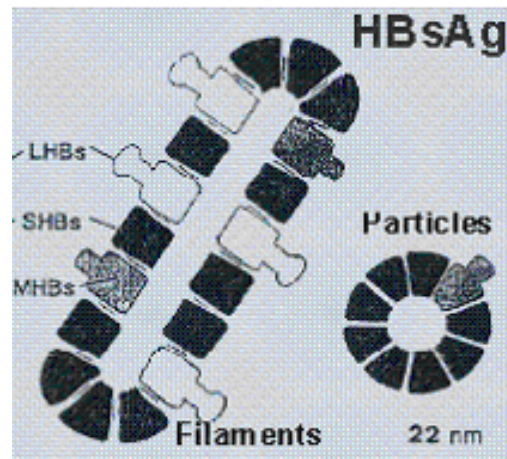


Figura 2. Filamenti e particelle sferiche costituite solo dall'envelope.

GENOMA VIRALE

Il genoma di HBV è costituito da una molecola circolare di DNA di circa 3200 (da 3182 a 3248 nucleotidi a secondo del genotipo)¹⁶ subunità nucleotidiche parzialmente a doppia elica. L'acido nucleico virale ha un filamento più lungo dell'altro. Il filamento breve S (+) ha una lunghezza variabile di 1700-2800 nucleotidi ed è solo il 50-80% del filamento lungo complementare denominato L o filamento (-), la quale lunghezza varia da 3020-3320 nucleotidi. I due filamenti mantengono una configurazione circolare grazie all'appaiamento di 240 nucleotidi in posizione 5'⁵⁶.

La catena L contiene 4 sequenze geniche denominate S, C, P e X (cosidette *open reading frames* [ORF]), le quali si sovrappongono ampiamente e codificano per la sintesi di 7 proteine virali. Al contrario, la catena S non contiene ORF (Figura 3).

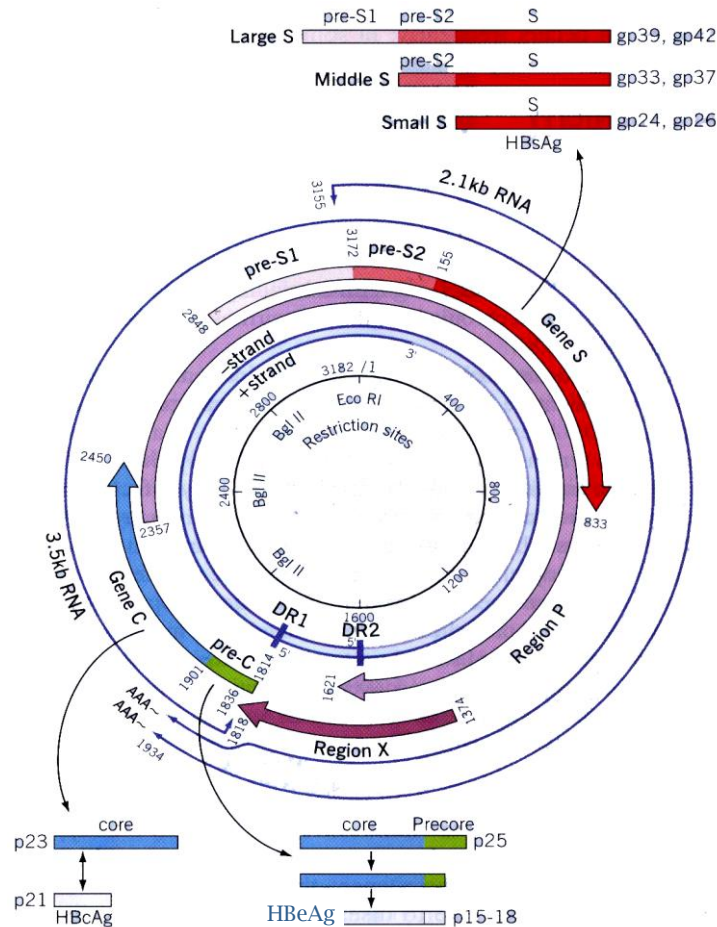


Figura 3. Struttura genomica del virus dell'epatite B.

REGIONE PRE-S/S

E' divisa in tre regioni che sono il pre-S1 (108-119 aa in relazione al genotipo)³¹, pre-S2 (55 aa) e il gene S (226 aa)⁶⁹. Queste regioni codificano i tre antigeni virali di superficie distinti in base al punto d'inizio della traduzione genica (proteina grande, media e piccola). La regione pre-S/S è contenuta nella sequenza più lunga *Pol*.

La proteina grande [L] (p39 e gp42) è codificata dalle regioni pre-S1, pre-S2 e dal gene S ed ha una lunghezza variabile in relazione al sottotipo/genotipo di HBV. Essa costituisce solo il 20% delle proteine dell'envelope ed è meno rappresentata a livello della superficie virale.

Tale proteina risulta essenziale per l'infezione e per la morfogenesi virale essendo implicata sia nel legame del virus ai recettori cellulari, nell'assemblaggio del virione e nel suo rilascio dalla cellula, sia nella sollecitazione della risposta cellulare B e T⁵⁷.

La sua presenza nel sangue della persona infetta è strettamente correlata con l'antigene HBeAg e con la presenza di HBV-DNA, due markers sierologici dell'infezione acuta⁵⁹.

La proteina media [M] (p30, gp33 e gp36)^{31, 67, 68} è codificata dalla regione pre-S2 e dal gene S. Essa ha un ruolo prioritario per la penetrazione del virus nell'epatocita, poiché contiene un recettore per l'albumina umana (aa 3 e aa 16). La proteina media è prodotta esclusivamente nella fase di infezione acuta⁵⁹.

La proteina piccola [S], chiamata anche *l'antigene S* o *HBsAg* (p24 e gp26) è codificata dal gene S e rappresenta la più piccola tra le proteine di superficie. Si chiama anche proteina maggiore (major) a causa della sua presenza dal punto di vista quantitativo. Il suo peso molecolare varia da 10,000 a 120,000 Dalton. L'HBsAg posto a temperatura ambiente o congelato resiste per anni. Il suo potere antigenico viene distrutto dal riscaldamento a 85°C per 1 ora o a 100°C per 5 minuti⁷⁶.

L'antigene HBsAg appare molto precocemente nel siero delle persone infettate nel corso dell'infezione, costituendo il primo marker sierologico dell'infezione e prevale nel siero dei portatori cronici.

La struttura dell'antigene S contiene due loop, come mostrato nella figura 4: il *cytosolic loop*, tra gli aminoacidi 29 e 80, il quale interagisce con le proteine del core, ed l'*immunodominant loop*, tra gli aminoacidi 101 e 163, localizzato all'interno del lume del reticolo endoplasmico e successivamente, ripresentato sulla superficie di virioni secreti. Quest'ultimo loop contiene 8 residui cisteinici i quali sono responsabili della formazione di legami disulfidici intramolecolari o intermolecolari ⁷⁴. All'interno della struttura dell'*immunodominant loop*, tra gli aminoacidi 124 e 147, si trova l'epitope antigenico maggiore, denominato *determinante "a"*, che è il determinante antigenico comune a tutti i sottotipi (Figura 4).

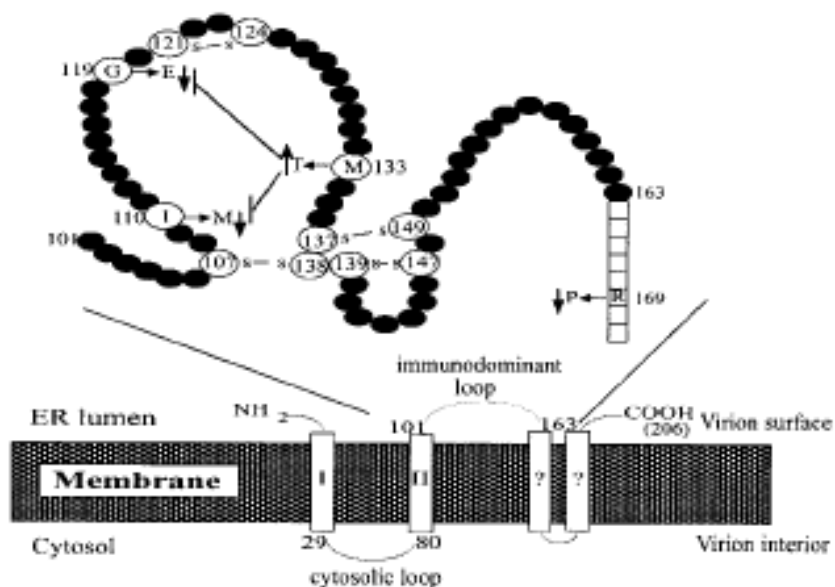


Figura 4. Struttura dell'HBsAg. Il pannello in basso rappresenta la proteina S, la quale attraversa la membrana del reticolo endoplasmico, probabilmente per quattro volte ³².

Esistono poi due coppie di determinanti tra loro rispettivamente esclusivi, *d/y* e *w/r*, i quali si distinguono dalla presenza dell'aminoacido lisina o arginina in posizione 122 (*d* oppure *y*) e 160 (*w* oppure *r*) della proteina S. Se l'aminoacido nella posizione 122 è Arg (122R) allora il determinato sarà il *y*, e se è Lys (122K) il determinato sarà il *d* ⁶². Allo stesso modo, 160R definisce il determinante *r* e 160K il *w* ⁶².

Successivamente, sono descritti quattro sottodeterminanti di *w* (*w1-w4*) di cui sono responsabili le mutazioni in posizione 127: gli aminoacidi Pro, Thr e Leu codificano rispettivamente per le varianti *w1/w2*, *w3* e *w4*⁷⁷. L'espressione di *w1* dipende anche dall'Arg¹²², Phe¹³⁴ e/o Ala¹⁵⁹.

Un'altro determinante *q* è stato espresso dalla gran parte dei ceppi HBV appartenenti ai sottotipi *adw4* e *adr*^{79,80}. Si suppone che la responsabilità per quest'ultimo sia attribuibile ai residui 177 e 178⁷⁸.

La combinazione fra determinanti e sottodeterminanti definisce i vari sottotipi di HBV.

Il ruolo essenziale del *determinante "a"* è di scatenare la risposta immune, sia naturale che indotta dalla vaccinazione, dell'intera proteina⁷⁵. Per tale motivo gli attuali vaccini anti-epatite B sono costituiti dall'antigene S. La presenza di soli anticorpi anti-HBs è sufficiente per la protezione di un individuo contro l'infezione.

Le mutazioni a livello della sequenza nucleotidica del *determinante "a"* danno luogo a varianti di HBV che "sfuggono" alla vaccinazione (*escape variant*), ossia producono infezione in soggetti che hanno titoli protettivi di anti-HBs⁷⁶.

REGIONE PRE-C/C

La regione *pre-C e C* (core o nucleocapside virale) codifica due proteine, l'antigene del core (*HBcAg*) e la proteina di secrezione (*HBsAg*), distinte a seconda del sito trascrizionale d'inizio.

Il trascritto della sola regione *C* (183 aa) codifica l'antigene del core (*HBcAg*), la proteina strutturale del capsido virale di 21 kd, all'interno della cui struttura terziaria si riconoscono due domini; il primo è coinvolto nell'assemblaggio del nucleocapside, il secondo nell'encapsidazione e replicazione virale⁶⁹.

La trascrizione a partire dalla sequenza *pre-C* (30 aa) comporta la sintesi della proteina pre-core di 25 Kd costituita dalla proteina del core più una sequenza addizionale di 29 aa. I primi 19 aa rappresentano una sequenza segnale che indirizzano la proteina pre-core verso la via secretoria; durante il passaggio attraverso il reticolo endoplasmico tale sequenza viene lisata da una peptidasi cellulare provocando la trasformazione della proteina Pre-core P25 nella proteina P22.

Tale proteina è poi secreta attraverso il reticolo endoplasmico e l'apparato di Golgi dove viene ulteriormente lisata in corrispondenza dell'estremità C terminale andando a costituire l'antigene solubile HBeAg di 15-18 Kd ⁶⁹.

L'HBeAg è il principale componente strutturale del nucleocapside e possiede in posizione carbossiterminale un dominio di 35 residui aminoacidici, ricco in arginina, ad elevata affinità per l'RNA e quindi favorente la formazione del capside ⁸⁴.

L'antigene del core HBcAg non è svelabile in circolo pur essendo presente nei nuclei degli epatociti fin dalle fasi primissime, perchè è ricoperto dall'antigene di superficie HBsAg. Quando il HBcAg viene espresso sulla superficie degli epatociti infettati, è il principale bersaglio della risposta immunitaria cellulo-mediata finalizzata alla distruzione degli epatociti infettati ⁷⁶.

Gli anticorpi HBcAb diretti contro HBcAg si repertano in tutti i soggetti esposti al virus; essi non sono protettivi e non permettono la distinzione tra evento acuto e cronico, rinvenendosi sia nel soggetto guarito che nel portatore cronico. La distinzione tra evento acuto e cronico si basa invece sul riscontro, nel primo caso, degli anticorpi anti-core di tipo IgM che non permettono però la discriminazione tra epatite acuta e riacutizzazione in corso di epatopatia cronica ⁶⁰.

L'HBeAg non è un componente della particella virale, ma è presente nel siero del soggetto infetto ed è un marcatore di attiva replicazione e di infettività; viene inoltre espresso sulla superficie degli epatociti insieme all'HBsAg ed è un importante bersaglio della risposta immune dell'ospite che porta alla distruzione della cellula infetta. L'eliminazione di HBeAg e la concomitante comparsa di anticorpi specifici si associa, salvo poche eccezioni rappresentate dalla selezione di mutanti HBeAg minus, al controllo immunitario dell'infezione virale.

Poiché l'HBeAg viene sintetizzato e secreto in circolo in grande quantità, sembra abbia la funzione di "distrarre" la risposta immunitaria (anticorpi e linfociti T citotossici) affinché non raggiunga il vero bersaglio, costituito dalla cellula infettata.

GENE POL

Il *gene Pol* (832 aa) costituisce l'80% del genoma virale e codifica la *polimerasi virale*. Il gene comprende quattro domini distinti, che codificano per enzimi essenziali al ciclo di

replicazione virale. E' costituita infatti dal dominio di *priming*, dal dominio di *spacer*, dal dominio di trascrittasi inversa che catalizza la sintesi del DNA-RNA dipendente, e dal dominio RNAsi-H che degrada l'RNA dell'ibrido DNA-RNA.

A differenza della polimerasi retrovirale, la polimerasi di HBV è priva di un dominio di integrazione.

Il gene *P* esprime una poliproteina la cui porzione amino-terminale è caratterizzata dalla presenza della DNA polimerasi-RNA dipendente, la quale si lega covalentemente all'estremità 5' del filamento di DNA (-) portando alla formazione di un ibrido DNA-RNA.

In posizione carbossi-terminale è invece localizzata la RNA-asi, proteina che porta alla proteolisi dell'ibrido, permettendo la sintesi del filamento complementare (+)⁸².

GENE X

Il gene *X* codifica per una proteina non-strutturale (*HBx*) di 154 aa che sembra avere una funzione regolatrice, esprimendo una proprietà transattivante nei confronti delle altre proteine virali e geni cellulari, giocando così un ruolo importante nel processo di epatocarcinogenesi⁸³.

La proteina *X* è essenziale per l'infezione di HBV e desta una particolare attenzione per la sua funzione pleiotropica. *HBx* non lega direttamente il DNA ma agisce tramite un'interazione proteina-proteina ed attiva importanti fattori trascrizionali indispensabili per la replicazione del DNA virale²⁰⁴.

L'infezione da epatite cronica di tipo B è associata con un aumento della produzione di ROS (*reactive oxygen species*), a sua volta collegato a processi infiammatori, dentro agli epatociti, che sono responsabili dell'ossidazione delle macromolecole intracellulari.

Il ROS può danneggiare il DNA inducendo mutazioni (stress ossidativo) ed inoltre può indurre l'attivazione di importanti fattori di trascrizione, quali il promotore della crescita, della proliferazione, della replicazione del DNA e coinvolge altre funzioni che inducono a morte cellulare o allo sviluppo di tumore.

HBx sembra attivare fattori di trascrizione cellulare attraverso lo stress ossidativo nelle cellule tramite la sua diretta associazione coi mitocondri portando all'innalzamento della ROS. Infatti *HBx* interagisce fisicamente e direttamente con un canale mitocondriale

esterno voltaggio-dipendente, causando una diminuzione del potenziale mitocondriale di membrana e l'innalzamento dei livelli di ROS.

Un valore aumentato di ROS può aumentare la replicazione virale, nonostante il meccanismo attraverso il quale la proteina X attivi questi fattori di trascrizione non sia ancora completamente chiarito²⁰⁴.

CICLO REPLICATIVO

HBV, insieme a tutti gli Hepadnavirus, impiega un metodo indiretto per la sua replicazione, la quale richiede come intermedio un filamento a RNA.

Il ciclo replicativo inizia con l'attacco del virus ad un recettore dell'epatocita. Sembra che in questo processo sia coinvolta la regione *pre-S* tra gli aminoacidi 21 e 47 del virus. A questo segue la fusione delle membrane cellulari, il virione viene privato dell'envelope ed il genoma virale raggiunge il nucleo cellulare (Figura 5).

A livello nucleare il genoma virale costituito da DNA circolare parzialmente a doppia elica, che si chiama RC-DNA (*relaxed circular DNA*), viene trasformato in DNA circolare a doppio filamento (ccc-DNA, *covalently closed circular*) in seguito ai seguenti step:

- il filamento (+) di DNA viene completato
- si eliminano l'oligoribonucleotide in posizione 5' del filamento (+) e l'eccessiva parte terminale del filamento (-) di DNA insieme alla polimerasi virale attaccata a quest'ultimo
- i due filamenti si legano uno all'altro e formano il ccc-DNA¹⁴.

E' importante notare che tutti gli step sopra citati sono evidentemente compiuti tramite l'attività di enzimi cellulari, indipendentemente dalla polimerasi virale.

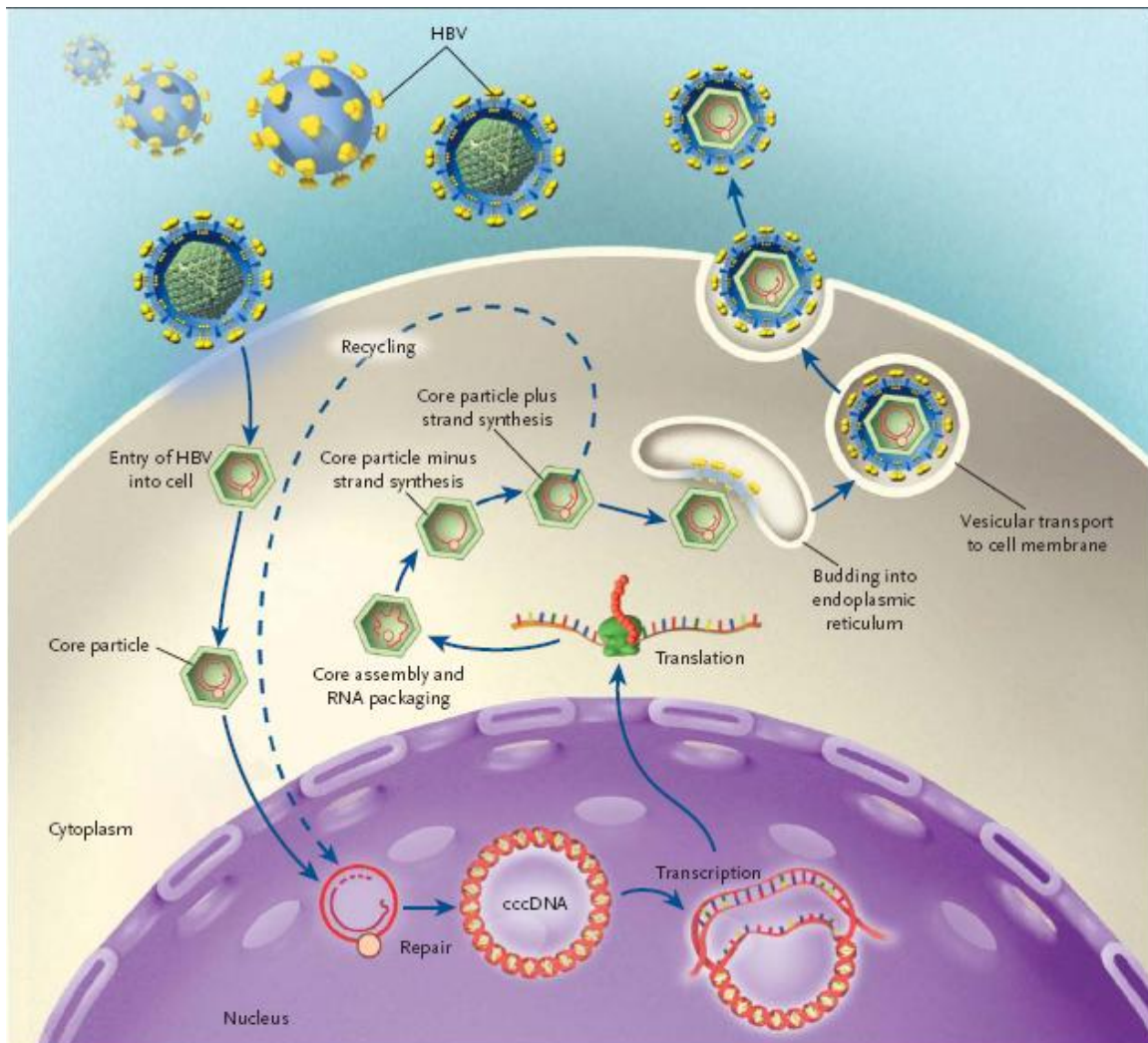


Figura 5. Ciclo vitale di HBV ⁶⁶.

Il ccc-DNA funge da stampo per la trascrizione di trascritti genomici e subgenomici ad opera dell'enzima RNA polimerasi II della cellula ospite; questi vengono poi trasportati a livello citoplasmatico dove ha luogo la sintesi delle proteine funzionali e strutturali del virione ⁶³.

I trascritti subgenomici di 2,4 Kb, 2,1 Kb e 0,7 Kb codificano le proteine dell'envelope (HBsAg) e la proteina X; i due trascritti di 3,5 Kb costituiscono l'mRNA precore che codifica la proteina precore (HBeAg) e l'mRNA pregenomico, costituita da 3500 nucleotidi, che svolge la duplice funzione di codificare la proteina del core e la polimerasi e fungere da stampo per la trascrittasi inversa.

Le proteine dell'envelope e quella del core vengono sintetizzate ed assemblate in modo autonomo le une dalle altre: le prime nel reticolo endoplasmico ruvido, la seconda a livello citoplasmatico.

Il primo step nella replicazione virale è l'incorporazione dell'RNA pregenomico e della proteina Pol all'interno di proteine del core assemblatesi a formare il nucleocapside.

Quest'incorporazione è indotto direttamente dall'*HBV-RNA encapsidation signal epsilon*, che consiste di una regione terminale dell'RNA pregenomico di circa 130 nucleotidi in posizione 5', con una struttura stem-loop. Le mutazioni in questo regione portano ad una replicazione meno efficiente del virus oppure alla creazione di particelle virali non vitali⁵⁵.

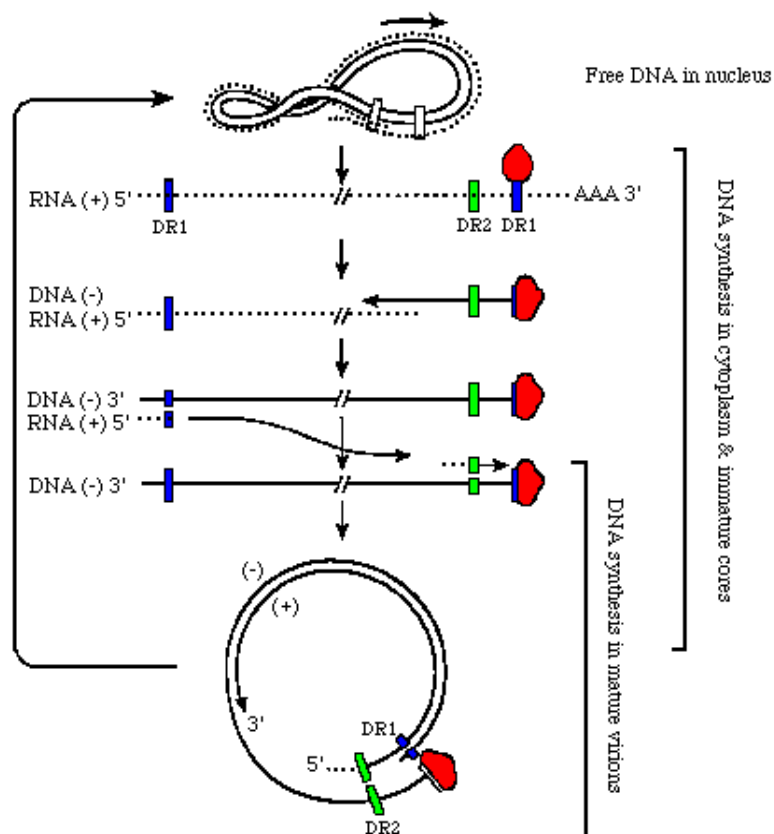


Figura 6. Rappresentazione schematica³⁰ della retrotrascrizione dell'RNA pregenomico da parte della polimerasi virale RNA-dipendente (colore rosso) e la sintesi di due filamenti del DNA virale.

All'interno del nucleocapside, un singolo filamento dell'RNA pregenomico viene retrotrascritto in un filamento di DNA genomico a polarità negativa. Non appena quest'ultimo si è formato, vi è una degradazione dell'RNA pregenomico ad opera di una RnaseH, avanzando solo di una porzione piccola dell'RNA, che è un oligoribonucleotide non digerito in posizione 5' (Figura 6) ³⁰. Questo frammento dell'RNA si include nella regione DR1 e poi, viene legato nella regione DR2 di DNA in posizione terminale 5'. Successivamente, l'HBV polimerasi genera il filamento complementare (+) del DNA utilizzando questo oligoribonucleotide come primer e usando il filamento (-) come stampo ⁶³. La catena positiva rimane incompleta poiché la stessa polimerasi è in seguito privata dei precursori trifosfati.

Il nucleocapside così costituito viene internalizzato nel reticolo endoplasmico passando attraverso il quale acquisisce le proteine dell'envelope costituite dall'antigene di superficie virale. Dopo di questo, il virione maturo fuoriesce dalla cellula epatica. In questo momento, il filamento positivo cessa immediatamente di allungarsi. Questo meccanismo spiega la variabilità nella sua lunghezza.

Un aspetto particolare del ciclo replicativo di HBV che sta alla base dell'infezione persistente è che una piccola parte di nucleocapsidi non viene indirizzata verso la via secretoria, tornando invece nel nucleo dove il DNA genomico viene convertito in ccc-DNA; ciò permette di creare una riserva stabile di molecole di ccc-DNA che fungano da stampo trascrizionale senza la necessità di multiple reinfezioni ⁶⁵.

PATOGENESI

Ancora oggi non è stato completamente chiarito l'esatto meccanismo patogenetico delle epatiti virali acute e croniche: poichè per nessuno dei virus epatitici maggiori è stato inequivocabilmente dimostrato un effetto citopatico diretto, si ritiene che un ruolo fondamentale sia svolto dalla risposta immunitaria dell'organismo umano nei confronti dei virus epatitici.

Le numerose ricerche condotte negli ultimi anni hanno permesso di far luce sulla patogenesi dell'epatite B e soprattutto sui meccanismi responsabili della cronicizzazione dell'infezione.

Il danno epatico è provocato dalla risposta immunitaria cellulo-mediata diretta verso gli antigeni del nucleocapside virale (HBcAg, HBeAg) che sono espressi sulla superficie degli epatociti infettati insieme agli antigeni maggiori di istocompatibilità di classe I (HLA-I) ⁷⁶.

Dopo l'infezione, il virus B raggiunge gli epatociti e replica; le particelle complete assieme all'eccesso di HBsAg vengono liberate dall'epatocita in assenza di ogni effetto citopatico e passano nella circolazione sanguigna.

Qui vengono riconosciute da macrofagi e linfociti natural killer (NK), i quali fanno parte dell'**immunità naturale**, che costituisce il primo meccanismo di protezione antivirale in corso di infezione acuta. Gli epatociti infetti producono IFN- α e IFN- γ tramite cui ha luogo il richiamo intraepatico di cellule dell'immunità innata, responsabili a loro volta della secrezione di grandi quantità di citochine, IFN- γ e TNF- α , attraverso le quali si ha una up-regulation dell'espressione di molecole HLA di classe I sulla superficie epatocitaria ¹⁴⁹.

Alla fase sintomatica dell'infezione acuta corrisponde l'attivazione della **risposta cellulare specifica** (Figura 7) ⁶⁶ sostenuta da linfociti T citotossici CD8+ e T helper CD4+.

I primi riconoscono gli antigeni HBcAg e HBsAg presentati sulla superficie cellulare dell'epatocita infetto associati a molecole MHC-I ¹⁵⁰. Questa può comportare la lisi diretta dell'epatocita infetto o il rilascio di citochine quali IFN- γ e TNF- α in grado di down-regolare la replicazione virale negli epatociti circostanti ¹⁵¹.

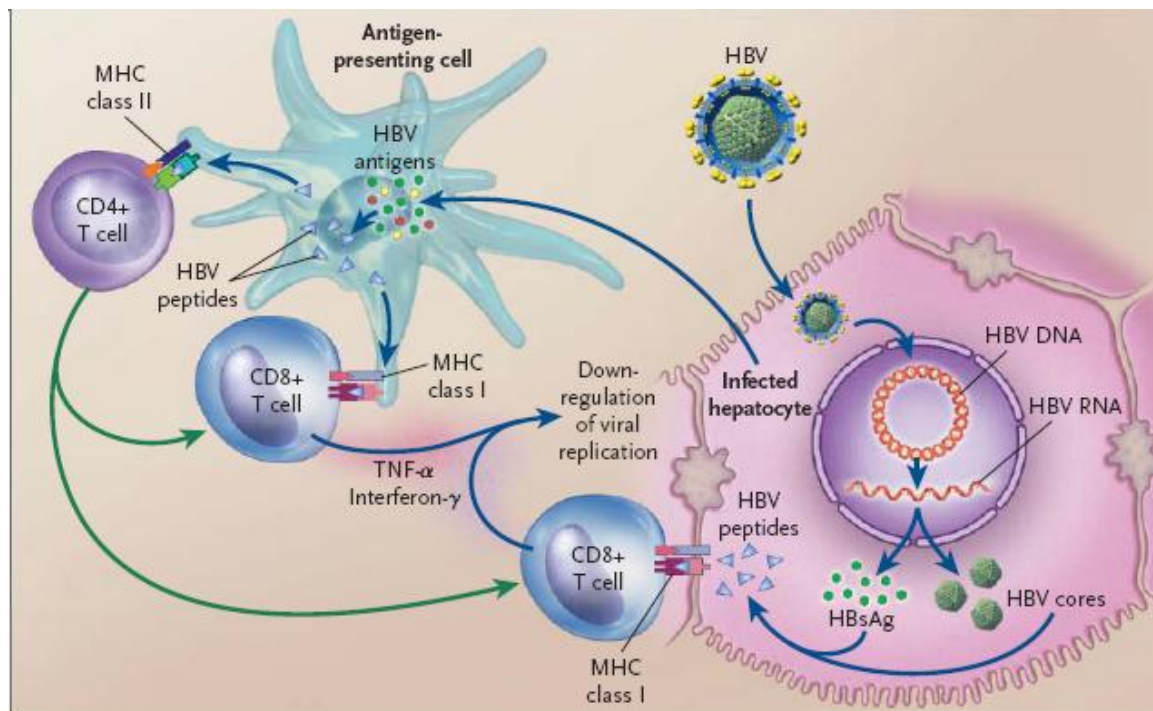


Figura 7. Risposta immunitaria cellulo-mediata ad HBV ⁶⁶.

All'attivazione dei linfociti T citotossici consegue l'innescò della risposta infiammatoria aspecifica sostenuta da TNF, radicali liberi e proteasi responsabili del danno cellulare. Numerosi dati sono a favore del controllo della replicazione virale esercitata dai linfociti T citotossici in assenza di una completa eradicazione dell'infezione: questo supporta l'ipotesi secondo cui, dopo la risoluzione favorevole dell'evento acuto persisterebbero minime quantità di virus replicante evidenziabili solo tramite metodiche di amplificazione genica (PCR) ¹⁵².

A supporto dell'azione antivirale dei linfociti T citotossici si sviluppa la risposta cellulare mediata dai linfociti T helper limitata ad antigeni proteici, in particolare HBcAg e HBeAg, presentati sulla superficie di cellule presentanti l'antigene (APC), quali i macrofagi ¹⁴⁹.

All'attivazione dei linfociti CD4+ consegue il rilascio di citochine responsabili della proliferazione cellulare T, dell'aumentata espressione epatocitaria di molecole MHC-I e dell'inibita replicazione virale.

I linfociti T helper sono inoltre responsabili della differenziazione delle plasmacellule in linfociti B attivati, e quindi della **risposta anticorpale**.

La produzione di anticorpi è un elemento critico per la neutralizzazione di particelle virali solubili, e per impedire l'ingresso dei virioni negli epatociti.

Tuttavia, si è concordi nel ritenere che l'evoluzione favorevole o no dell'infezione acuta dipende dall'efficienza della risposta cellulo-mediata specifica, in quanto la risposta umorale è vigorosa sia nel corso dell'infezione acuta autolimitantesi che in quella ad evoluzione cronica.

Se la risposta immunitaria è *normale* e riesce ad eliminare tutti gli epatociti infettati, il paziente sviluppa una epatite acuta autolimitantesi che va incontro a guarigione: tale evento si verifica nel 90-95% dei pazienti adulti immunocompetenti.

Se la risposta immunitaria è *debole* ed i linfociti presenti nel fegato sono numericamente insufficienti rispetto alle cellule epatiche infettate, si verifica una continua necrosi degli epatociti infettati che non riesce tuttavia ad eliminare completamente gli epatociti infettati ed il virus continua a replicarsi: ne consegue che il paziente sviluppa una epatite cronica B con segni istologici di attività.

Se la risposta immunitaria è completamente *inefficace* (assente), non si ha necrosi degli epatociti infettati oppure il danno epatico è minimo pur in presenza di virus replicante: ne consegue la condizione del portatore cronico inattivo che presenta livelli di HBsAg sierici anche elevati in assenza di flogosi intraepatica.

Se la risposta immunitaria è *eccessiva* (esaltata), si può verificare una necrosi massiva degli epatociti che conduce il paziente all'*exitus* (epatite fulminante) ⁷⁶.

FASI DELL'INFEZIONE

Il ciclo naturale dell'infezione da HBV prevede due fasi distinte, una replicativa e una seconda integrativa, a loro volta suddivise ciascuna in due stadi ¹⁵⁵.

I. Fase replicativa

I° stadio: è caratterizzato dall'immunotolleranza ed è associato ad elevati livelli di replicazione virale in assenza di danno citolitico epatico.

Tale stadio in corso di infezione acuta nel bambino e nell'adulto corrisponde al **periodo di incubazione** di due-quattro settimane prima dell'insorgere della risposta immunitaria, mentre nel caso del neonato acutamente infettato può durare anni.

2° stadio: durante questo stadio si instaura la risposta immunitaria che comporta la lisi diretta degli epatociti infetti; esso corrisponde pertanto al **periodo sintomatico** caratterizzato da livelli minori di HBV-DNA in circolo e da alterazione degli indici di lisi epatica.

La durata di tale stadio dipende dall'efficienza della risposta immunitaria specifica: se l'evoluzione è favorevole si tratta di 3-4 settimane, in caso di persistenza si assiste invece a cronicizzazione dell'infezione.

II. Fase integrativa

1° stadio: corrisponde al termine della replicazione virale attiva dovuto alla distruzione di tutte le cellule infette, in caso di evoluzione favorevole, o di gran parte di esse, in caso di cronicizzazione.

Questa fase è identificabile dalla **sieroconversione ad anti-e**, da un marcato decremento dei livelli di HBV-DNA, pur potendosene trovare ancora una minima quantità tramite metodiche di biologia molecolare (PCR), dalla normalizzazione dei livelli degli enzimi epatici e dalla persistenza dell'antigene s.

In corso di infezione acuta del bambino e dell'adulto questa fase, nella maggior parte dei casi, ha luogo rapidamente, al contrario nel caso in cui sia interessata l'età neonatale il tasso annuale di sieroconversione è del 5-15%.

Questo dato è compatibile con l'osservazione secondo cui la probabilità di cronicizzazione è strettamente correlata all'età di acquisizione: l'infezione contratta in età neonatale cronicizza fino al 90% dei casi in cui la madre portatrice sia HBeAg positiva, nel 25-50% dei casi in cui il contagio abbia luogo nei primi 5 anni di vita e nel 6-10% se ad essere interessati sono bambini di età maggiore e gli adulti ¹⁵³.

Il meccanismo alla base della mancata o scarsa clearance virale in età neonatale sarebbe rappresentato dalla tolleranza immunitaria all'antigene *e*, dovuta all'incompleto sviluppo del sistema immunitario ¹⁵⁴.

I meccanismi immunitari patogenetici implicati nell'evoluzione cronica in età adulta nei pazienti immunocompetenti non sono state del tutto chiarite. Nel corso degli anni si sono

accumulate diverse evidenze sperimentali che i pazienti con epatite cronica B possono presentare diverse alterazioni quali: una scarsa risposta anticorpale diretta contro gli antigeni codificati dalla regione pre-S, che sarebbe responsabile di un fallimento della neutralizzazione virale; una ridotta od assente produzione di interferone alfa che favorirebbe la replica virale; una ridotta produzione di interleuchine, un difetto della risposta dei linfociti T suppressor verso gli antigeni del nucleocapside virale. Di tutte le alterazioni citate la più importante appare indubbiamente il difetto funzionale dei linfociti T citotossici che può essere provocato da diversi fattori: presenza di elevata e persistente viremia (le alte cariche virali determinano un “esaurimento funzionale” dei linfociti T); stato di immunotolleranza nei confronti del virus indotto dall'eccesso di HBeAg; espressione di alcuni particolari antigeni di istocompatibilità sulla superficie degli epatociti; deficit funzionale dei linfociti T helper (il cui compito è di coadiuvare i linfociti T citotossici) od infine infezione degli stessi linfociti T citotossici da parte del virus ⁷⁶.

Merita di essere sottolineato che la selezione di mutanti virali è da considerarsi l'effetto dell'infezione persistente piuttosto che la causa.

2° stadio: è quello in cui si realizza la completa immunità dovuta alla **sieroconversione ad anti-s**.

EPIDEMIOLOGIA E MODALITÀ DI TRASMISSIONE

Il virus dell'epatite B segue una strategia particolare nella sua distribuzione nella popolazione umana: in zone endemiche si trasmette da una generazione all'altra tramite la contaminazione durante l'infanzia, che di per sè, rappresenta un fattore che favorisce la persistenza cronica dell'infezione. Un terzo della popolazione mondiale ha evidenza sierologica di un'infezione passata o presente di HBV e 350-400 milioni di persone sono ancora infetti cronici; di questi il 78% di loro vive in Asia, il 16% in Africa, il 3% in Sud America e il 3% in Europa, Nord America e Oceania ³⁷.

Le regioni ad **alta endemia**, dove la prevalenza di infezione cronica è superiore all'8% e il 70-98% della popolazione ha evidenza sierologica di passata o intercorrente infezione,

includono la regione Asia-Pacifico, l’Africa Sub-Sahariana, ed il bacino Amazzonico. Circa il 45% della popolazione mondiale vive in paesi ad alta endemia per l’HBV⁵⁴. Le regioni ad **endemia intermedia**, dove la prevalenza di HBsAg positiva è compresa tra 1-8% ed in cui il dato sierologico di avvenuto contatto si riscontra nel 10-60%, sono: il Giappone, India, la parte meridionale dell’Oriente, Europa Centrale e Medio Oriente³⁴. Tutte le altre regioni rimanenti si considerano a **bassa endemia**, dove la prevalenza di portatori HBsAg positiva è inferiore al 1% e l’esposizione ad infezione è 0.5-2%³⁴ (Figura 8).

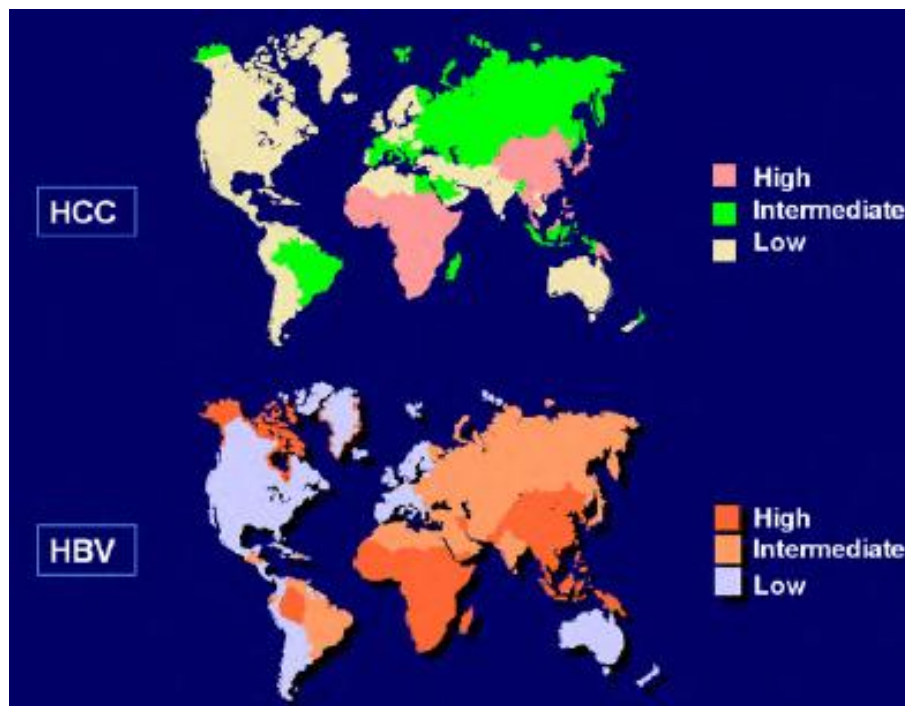


Figura 8. Distribuzione geografica parallela dell’infezione cronica da HBV e della carcinoma epatocellulare³⁴.

La trasmissione verticale è un fattore determinante per lo sviluppo dell’infezione cronica di HBV ed è la via predominante dell’acquisizione dell’infezione nei paesi ad alta endemia come quelli della regione dell’Asia-Pacifico. Se la madre è HBsAg e HBeAg positiva il rischio di trasmissione perinatale è stimato essere 70-90% e in questo caso il 90% dei neonati cronicizzerà; nel caso in cui invece la madre sia HBsAg positiva ma

HBeAg negativa il rischio di trasmissione è ridotto al 10-40% e quello di cronicizzazione al 40-70%⁴⁴.

La trasmissione orizzontale del virus nella prima infanzia è determinante nei paesi endemici ed è la fonte principale dell'infezione in Africa Sub-Sahariana⁴⁴. Il tasso di cronicizzazione è del 50% all'età di 5 anni.

L'acquisizione della malattia in età adulta si contrae in paesi a bassa endemia. Succede a seguito di rapporti sessuali a rischio, in omosessuali maschi, per via parenterale (tossicodipendenti, tatuaggi, piercing, etc.) e in soggetti esposti a rischio professionale³⁸.

Attualmente, i movimenti della popolazione e la migrazione stanno cambiando la prevalenza e l'incidenza della malattia ovunque, ma soprattutto in alcuni paesi europei a bassa endemia⁴⁹.

L'utilizzo di modelli per dedurre la storia demografica passata delle popolazioni sulla base degli alberi genealogici, insieme ai metodi più efficaci per la stima dei tassi di evoluzione e tempi di divergenza di sequenze heterochronous (sequenze isolate in periodi di tempo piuttosto lunghi) hanno recentemente reso possibile lo sviluppo di modelli di coalescenza per lo studio della dinamica di popolazioni virali a livello intra- e inter-ospite. Questo approccio "filodinamico"²²⁹ è stato utilizzato per studiare l'epidemiologia passata/recente di infezioni causate da virus a RNA altamente variabili come HCV²³⁰⁻²³², HIV^{233, 234}, West Nile Virus²³⁵, foot and mouth disease virus (FMDV)²³⁶ e più recentemente, da virus a DNA²³⁷.

Sulla base del *tasso di crescita* (r) è possibile stimare il *numero riproduttivo di base* (R_0) di un'infezione²³⁰, che rappresenta il numero medio di casi secondari infettati da un singolo caso primario in una popolazione senza difese immunitarie. L' R_0 viene calcolato in base della durata dell'infezione nei portatori. Oltre alla durata dell'infettività, una serie di altri fattori possono influenzare l' R_0 , come la modalità e l'efficienza della trasmissione dell'infezione nella popolazione. Varie stime dell' R_0 di HBV sono state pubblicate¹⁶⁴. Medley²¹² ha suggerito che R_0 è compresa tra i valori di 1 e 2 nei paesi a bassa endemia. Il valore dell' R_0 cambia anche in base ai sottogenotipi. La stima dell' R_0 del sottogenotipo D3 è significativamente più alta rispetto al sottogenotipo A2⁸⁵. Ciò può essere dovuto alle diverse modalità di trasmissione dei sottogenotipi di HBV nella popolazione: il

sottogenotipo A2 viene trasmesso principalmente attraverso la via sessuale, mentre il D3 con la via parenterale (trasfusioni di sangue e i suoi derivati, iniezioni non sicure, etc.).

L'aspetto clinico della malattia causata da HBV varia dall'epatite acuta ad uno stato di portatore "inattivo" asintomatico con viremia bassa, oppure ad epatite cronica progressiva. Da quest'ultima, la malattia può evolvere in cirrosi con un tasso annuale di 2-5% in pazienti HBeAg positivi e in carcinoma epatocellulare (HCC) con incidenza cumulativa del 15-20% ogni 5 anni ¹⁵⁶. L'HCC costituisce il quinto tipo di cancro più comune ed il 5% di tutti i tipi di cancro. La sopravvivenza nella cirrosi compensata è dell'80-86% in 5 anni, mentre nella cirrosi scompensata è del 14-35% in 5 anni ¹⁶¹.

L'insufficienza epatica scompensata HBV-correlata insieme all'HCC sono responsabili della morte di circa 1 milione di persone ogni anno ^{66, 165}, ed attualmente, rappresentano il 5-10% dei casi di trapianto del fegato ^{66, 166}.

I fattori virali e quelli dell'ospite, oltre alla coinfezione con il virus dell'epatite C (HCV), virus dell'epatite D (HDV) oppure il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), insieme alla coesistenza di danno al fegato dall'abuso alcolico ed al sovrappeso, possono influenzare il decorso naturale dell'infezione cronica da HBV oltre che l'efficacia delle strategie terapeutiche antivirali ⁴⁹.

La vaccinazione contro l'HBV è stata incorporata per lungo tempo in un programma di immunizzazione nei paesi dell'Africa Sub-Sahariana e della regione Asia-Pacifico dove la prevalenza dell'infezione cronica è molto alta. A seguito, nelle persone immunizzate è stata ottenuta una riduzione molto alta del tasso dell'infezione cronica di HBV. La prevalenza dei portatori di HBsAg è scesa dall'8% a 1% ³⁸. Il vaccino contro HBV è uno dei vaccini più usati nel mondo oggi e, attualmente, è compreso nei programmi di immunizzazione nella maggioranza dei paesi. L'inclusione universale del vaccino nel *Expanded Programme of Immunization* in tutti i paesi porterà, dopo un periodo opportuno, alla scomparsa dell'infezione da HBV e successivamente, alla scomparsa delle complicanze quali cirrosi e carcinoma epatocellulare HBV-correlata ¹⁶⁷.

SOTTOTIPI

Secondo i risultati di diverse analisi sierologiche su HBsAg, i ceppi del virus dell'epatite B sono classificati in 10 sottotipi che rappresentano la manifestazione fenotipica di mutazioni a livello genomico: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw3*, *adw4q-*, *adrq+*, *adrq-*^{14, 62, 77}. La correlazione sottogenotipo-sottotipo e la distribuzione geografica per ciascun sottotipo sono presentati nella tabella 2.

La classificazione sierologica dell'HBV è stata usata per motivi epidemiologici, e in qualche caso, per rintracciare anche l'eventuali infezioni nosocomiali da HBV, per definire la correlazione tra malattia e sottotipo specifico responsabile. Tuttavia, nell'ultimo decennio, la determinazione sierologica è stata sostituita gradualmente dalla genotipizzazione⁵⁵. I genotipi hanno un ruolo maggiore nella determinazione della gravità clinica e sviluppo della infezione cronica¹⁵. Inoltre, l'avvenimento dell'epatite B cronica HBeAg negativa è genotipo-specifica¹⁵.

GENOTIPI E SOTTOGENOTIPI

Precedentemente sono stati presentati 8 genotipi diversi rinominati, secondo l'ordine alfabetico, dall'A a H. I primi quattro genotipi (A-D) sono stati descritti dall'Okamoto nel 1988⁸⁷, mentre gli altri (E-H) sono stati caratterizzati nel corso degli ultimi due decenni¹⁴. Recentemente, è stato proposto il nono genotipo "I" evidenziato nella Cina Nord-Occidentale²⁷, India dell'Est⁸⁹, Laos⁹⁰ e Vietnam⁹⁰⁻⁹², nonostante sia ancora oggetto di dibattito⁹²⁻⁹⁴, poiché potrebbe essere un ceppo ricombinante HBV/ACG⁹². Molto recentemente, è stato presentato il decimo genotipo nominato provvisoriamente come "J" isolato in un paziente giapponese con HCC⁹⁵.

La definizione "*genotipo*" è basata su una divergenza superiore al 7.5% sulla sequenza dell'intera genoma o superiore al 4% sulla sequenza dell'antigene *s*¹⁵ per i ceppi appartenenti a genotipi diversi, e inferiore al 7.5% per i ceppi dello stesso genotipo⁸⁸.

La lunghezza del genoma completa di HBV può variare da 3182-3248 nucleotidi, secondo il genotipo, a causa di delezioni e inserzioni (Tabella 1) ¹⁶.

Genotipo	Lunghezza genotipo in bp	Differenze in ORF
A	3221	Inserzione dell'aa 153 e 154 in HBc
B	3215	
C	3215	
D	3182	Delezione dell'aa 1-11 in preS1
E	3212	Delezione dell'aa 11 in preS1
F	3215	
G	3248	Inserzione di 12 aa in HBc Delezione dell'aa 11 in preS1
H	3215	
J	3182	Delezione di 11 aa in preS1 ⁹⁵

Tabella 1. Caratteristiche fondamentali dei genomi e le differenze tra i genotipi di HBV.

Dato che la capacità codificante del genoma di HBV è ottimizzata con la sovrapposizione dell'*open reading frames*, ed ogni nucleotide partecipa alla codificazione di almeno una proteina virale, queste differenze nella lunghezza incidono su uno o più proteine. Per esempio, il gene P che codifica la polimerasi virale (Pol) si sovrappone parzialmente al gene C, il quale codifica l'HBcAg. I ceppi del genotipo A hanno un'inserzione di due codoni in prossimità della fine del gene C e di conseguenza, l'HBcAg e Pol, insieme, hanno due aminoacidi in più. Al contrario, il genotipo G ha un'inserzione di 36 nucleotidi immediatamente dopo il codone iniziale del gene C, aumentando la lunghezza dell'HBcAg di 12 aminoacidi. Questo non interessa il gene Pol, tranne che la delezione di un codone nella regione PreS1 riduce di un aminoacido il PreS1 e Pol ad entrambi ¹⁴.

Per quanto riguarda la distribuzione geografica dei vari genotipi (Figura 9), l'**A** e il **D** sono onnipresenti, anche se il genotipo **D** è relativamente raro nell'Europa del Nord e in America, ma è molto frequente nel bacino del Mediterraneo e in Medio Oriente. I genotipi **B** e **C** sono stati trovati essenzialmente in Estremo Oriente ¹²⁷.



Figura 9. La distribuzione geografica di genotipi e sottogenotipi di HBV ^{16,48}.

Il genotipo **E** è limitato nell’Africa Sub-Sahariana; sono anche riportati in letteratura dei casi rari in Francia, Inghilterra ed Arabia Saudita, probabilmente a causa dell’immigrazione ^{118, 119, 10}.

Il genotipo **F** è stato distribuito principalmente in America Orientale e Meridionale e la sua origine risiede nella popolazione Amerindiana.

Il caso del genotipo **G** è meno chiaro. Inizialmente, è stato rilevato negli Stati Uniti, Francia ed in Germania, e recentemente in Messico con una prevalenza alta ^{14,126,128}. Nonostante ciò, l’origine geografica del genotipo G rimane ancora sconosciuta ¹³⁰.

Il genotipo **H** è noto come il genotipo amerindio in quanto isolato in gran parte in America Centrale e California, in quest’ultima probabilmente a causa dell’immigrazione, ed in Giappone ^{14,125, 129}.

Quindi, i genotipi **F** e forse anche l’**H** possono essere definiti come genotipi del Pacifico/America Latina ¹⁴.

I genotipi **I** e **J** sono stati descritti precedentemente.

Dall'analisi della distribuzione geografica si può notare come i genotipi A, D, E, F e G siano diffusi in aree nelle quali la trasmissione orizzontale costituisce la principale via di infezione, a differenza dei genotipi B e C che sono prevalenti nelle aree ad endemia maggiore, dove la modalità di trasmissione verticale o perinatale assume un ruolo essenziale nella diffusione del virus.

L'evoluzione genotipica dell'HBV ha portato allo sviluppo di varianti differenti chiamati "sottogenotipi". Un sottogenotipo diviene sospetto quando la divergenza intragenotipica basata sulla sequenza dell'intera genoma è superiore al 4%³⁷.

I sottogenotipi conosciuti fino adesso sono 40 e la loro classificazione secondo i diversi genotipi è la seguente: A (A1-A7), B (B1-B8), C (C1-C10), D (D1-D8), F (F1a/b-F4), I (I1-I2).

	Sottogenotipo	Sottotipo*	Origine geografica	Referenza
A	A1 (Aa, A')	<i>adw2, ayw1</i>	Africa, Asia, South America	99,100
	A2 (Ae, A-A')	<i>adw2, ayw1</i>	Northern Europe, North America, South Africa	99,101
	A3 (Ac)		Cameroon, Gabon, Rwanda	102-104
	A4		Mali, Gambia	105,106
	A5		Nigeria, Rwanda, Cameroon, Haiti (pop. africana)	106,107,104,26
	A6		Congo, Rwanda	26
	A7	<i>ayw1, adw2, ay</i>	Cameroon, Rwanda	26,104
B	B1 (Bj)	<i>adw2</i>	Japan	108,109
	B2 (Ba)	<i>adw2, adw3</i>	Asia without Japan	16
	B3	<i>adw2, ayw1</i>	Indonesia, Philippines	7
	B4	<i>ayw1, adw2</i>	Vietnam, Cambodia	7
	B5		Philippines	111,112
	B6		Alaska, Northern Canada, Greenland	46,116,197
	B7		Indonesia	98
	B8		Indonesia	97
C	C1 (Cs)	<i>adrq+</i> , <i>ayr</i> , <i>adw2, ayw1</i>	South East Asia (Vietnam, Myanmar, Thailand, Southern China)	113-115
	C2 (Ce)	<i>adrq+</i> , <i>ayr</i>	Far East (Korea, Japan, Northern China)	16
	C3	<i>adrq-</i> , <i>adrq+</i>	Pacific Islands (Micronesia, Melanesia, Polynesia)	7,46

	C4		Australia	110
	C5		Philippines, Vietnam	33,112
	C6		Indonesia, Philippines	96
	C7		Philippines	117
	C8		Indonesia	97
	C9		Indonesia	97
	C10		Indonesia	24
D	D1	ayw2 , <i>adw1</i> , <i>ayw1</i>	Europe, Middle East, Asia, Tunisia, Egypt	2,3,5,8,10,21
	D2	ayw3 , <i>ayw1</i>	Europe, Morocco, India	11,2,22,6
	D3	ayw3 , <i>ayw2</i> , <i>ayw4</i>	South Africa, Asia, Europe, USA, Northern Canada	99,6,11,46,116
	D4	ayw2 , <i>ayw3</i>	Australia, Japan, Papua New Guinea	7,14
	D5		East India, Japan	6
	D6		Indonesia	96
	D7		Tunisia	21
	D8		Niger	25
E		ayw4 , <i>ayw2</i>	Sub-Saharan Africa, UK, France, Saudi Arabia	118,119,10
F	F1a	adw4 , <i>ayw4</i>	South and Central America	120,121
	F1b	adw4	Argentina, Japan, Venezuela, USA	14
	F2	adw4	South America (Brazil, Venezuela, Nicaragua)	122
	F3	adw4	Venezuela, Panama, Columbia, Bolivia	14,123,124
	F4	adw4	Bolivia, France, Argentina	14,123,124
G		adw2	USA, Germany, Japan, France, Mexico	14,126,128
H		adw4	Usa, Japan, Nicaragua	14,125
I	I1	adw2	Laos, Vietnam, Northwest China	90,27
	I2	ayw2	Laos, Vietnam	90
J		ayw	Japan	95

* I sottotipi principali sono mostrati in grassetto.

Tabella 2. Sottogenotipi, sottotipi e prevalenza geografica di HBV.

Solo durante il periodo 2008-2010 sono identificati sette nuovi sottogenotipi in Indonesia, che sono il C6 e D6 in Papua⁹⁶ ed il B7, B8, C8, C9, C10 in Nusa Tenggara^{24, 97, 98}.

I genotipi e sottogenotipi hanno una distribuzione geografica specifica che riflette una evoluzione antica¹⁴. Tuttavia, dal momento che i pazienti possono essere infetti cronici, il quadro evolve a causa di migrazione umana³⁷. Questi dati sono riportati nella figura 9 e nella tabella 2, insieme alla correlazione tra i diversi sottogenotipi e sottotipi sierologici^{14, 16}.

MUTANTI DI HBV

Il primo studio che si prefissò di stimare il tasso di mutazione di HBV fu riportato nel 1987 da Okamoto e collaboratori⁵⁵, basato sulla comparazione di differenti cloni di HBV isolati dal siero di una donna di 54 anni infetta dalla nascita.

Il tasso di mutazione fu stimato tra 1,4 e $3,2 \times 10^{-5}$ sostituzioni per sito per anno, molto più elevato rispetto a quello degli altri virus a DNA, nonostante sia più basso di quello dei retrovirus e di altri virus a RNA. Uno studio successivo condotto nel 1989 da Orito portò alla scoperta di un tasso di mutazioni silenti pari a 5×10^{-5} per sito per anno, ponendo la percentuale di mutazione di HBV tra i virus a DNA e i retrovirus²⁰⁶.

Altri risultati furono riportati da Hannoun nel 2000, dove le sostituzioni non-silenti furono stimate come l'88% di tutte le sostituzioni osservate in pazienti che erano stati infettati verticalmente²⁰⁶.

Il tasso di sostituzione in vivo dipende da un numero di fattori tra loro separati ma interdipendenti. Gioca senza dubbio un ruolo essenziale la presenza di un genoma compatto ed il peculiare meccanismo di replicazione virale basato su uno stadio di trascrizione inversa da parte della DNA polimerasi virale, particolarmente suscettibile di errori per la mancanza dell'attività di proof-reading, attività esonucleasica di correzione di errori di incorporazione nucleotidica. Inoltre nella variabilità virale sono implicati anche fattori legati all'ospite, quali la risposta immune e l'esposizione a trattamenti antivirali. La risposta dell'ospite appare come un fattore molto importante, essendoci

evidenze che il tasso di mutazione nei decenni risulti irrilevante in caso di infezione silente, quando cioè la risposta immune dell'ospite è minima²⁰⁶.

La presenza tuttavia di lunghe delezioni ed inserzioni nel genoma virale suggerisce che altri meccanismi possano avere un ruolo nell'insorgenza di varianti virali, come ad esempio la ricombinazione tra diversi ceppi di HBV coinfectanti uno stesso individuo²⁰⁸.

Non sono presenti zone più conservate rispetto ad altre e quindi nel DNA virale le mutazioni possono insorgere in tutti i geni di HBV.

Se si considerano l'elevata efficienza di replicazione del virus (con rilascio fino a 10^{11} particelle virali al giorno), la sua permanenza in soggetti cronici, la pressione immunitaria esercitata dall'ospite e dalle terapie antivirali, si può comprendere come possano accumularsi singole mutazioni e far emergere ceppi interessanti dal punto di vista epidemiologico.

Mutazioni virali sono state scoperte sia in soggetti affetti da epatite acuta o fulminante, sia in quelli con infezione di tipo cronico e possono riguardare diverse parti del genoma.

Per questo si riconoscono mutanti nel gene preC/C, nel gene preS/S, nel gene della polimerasi e nel gene X²⁰⁹.

Poiché i geni sono ampiamente sovrapposti, l'insorgenza di una mutazione spesso porta alla modificazione di più di un prodotto genico. Si possono generare in questo modo delle varianti virali che hanno un vantaggio selettivo sul ceppo selvatico (*wild type*), nonostante la maggior parte delle mutazioni produca virus incapaci di sopravvivere o senza alcun effetto fenotipico. Esiste sempre una selezione che opera sui mutanti, in modo da far "sopravvivere" il virus mutato con il genotipo che meglio riesce ad adattarsi alle condizioni in cui si trova. Altre forze selettive possono essere rappresentate dall'immunità indotta dalla vaccinazione e dal trattamento con farmaci antivirali. Tale selezione avviene sia a livello cellulare a favore del virus che replica in modo più efficace, che a livello extracellulare a seconda delle caratteristiche del sistema immunitario dell'ospite.

Il virus dell'epatite B offre un chiaro esempio di come un virus possa eludere il sistema immunitario e sopravvivere nell'ospite. La variazione di un determinante antigenico rende il virus mutato non più riconoscibile dagli anticorpi prodotti contro il ceppo

selvatico permettendone la replicazione (*escape mutant*). Questo è valido sia per un riconoscimento anticorpale sia di tipo cellulo-mediato⁸⁴.

MUTANTI DELLA REGIONE PRE-C/C

Il gene core insieme alla regione pre-core sono deputati alla codificazione dell'antigene HBe. Sono state identificate delle mutazioni nella regione pre-core, che bloccano la secrezione dell'antigene. Infatti sono stati segnalati casi di pazienti che, nonostante mostrassero una sierconversione ad anti-HBe, mostravano una malattia progressiva caratterizzata da un'elevata concentrazione di HBV-DNA nel siero, mantenendo così la replicazione virale ed il danno epatico¹²⁶. La mutazione puntiforme più recentemente identificata in questi soggetti attraverso sequenziamento consiste nella sostituzione di G con A in posizione 1896 (G1896A), che comporta l'introduzione di uno stop codon (TAG) al posto del codone che codifica per il triptofano comportando la prematura terminazione della trascrizione e mancata sintesi dell'HBeAg. Questa mutazione non influisce sulla produzione dell'antigene HBcAg, in quanto la sua traduzione inizia a valle del codone di stop.

Il mutante G1896A è stato riscontrato in soggetti cronici o in portatori asintomatici in aree geografiche, quali il bacino del Mediterraneo (20-90%) e l'Estremo Oriente (10-50%), dove si ha una maggiore prevalenza del genotipo D, mentre il mutante pre-C è presente con una bassa frequenza nel Nord America (<10%), nell'Europa Occidentale e nell'Africa Meridionale, dove circolano prevalentemente i genotipi A e C²¹¹.

Altre mutazioni che cadono in questa regione ed interferiscono con l'espressione di HBeAg sono state evidenziate in posizione 1814/1815, 1874 e 1862, nonostante abbiano bassa frequenza. Nel siero di pazienti infetti con queste varianti di HBV, l'HBeAg non è rilevabile e non è nemmeno espresso sulla superficie degli epatociti, che in questo modo riescono ad eludere la risposta immunitaria, con conseguente prolungamento dell'infezione e progressione verso quadri clinici più severi. Questi pazienti mostrano un'attiva replicazione virale, supportata dalla positività di HBV-DNA, pur con negatività dell'antigene "e" e positività degli anticorpi anti-HBe. Durante i primi stadi dell'infezione cronica, il decorso clinico è breve e le infezioni miste (*mutante/wild type*) sono abbastanza frequenti, anche se queste tendono, durante la fase di eliminazione virale

sotto la pressione immunologica dell'ospite, ad evolvere in favore dei mutanti, che continuano ad aumentare numericamente fino a quando il ceppo *wild type* non è scomparso.

L'epatite portata da queste mutazioni virali (*HBe minus*), oltre a mostrare un decorso in genere più grave rispetto al *wild type*, presenta anche una minore risposta alla terapia con gli interferoni⁸⁴.

Inoltre sono state osservate delle mutazioni a livello del gene core in soggetti immunocompromessi ed in pazienti orientali con epatite cronica o carcinoma epatocellulare. Tali varianti virali comportano la perdita degli epitopi riconosciuti dalle cellule B e T, conferendo un vantaggio selettivo al virus contro la risposta immunitaria dell'ospite. Non sembra che queste varianti siano associate ad un'induzione dell'infezione cronica²¹³.

MUTANTI DELLA REGIONE PRE-S/S

Oltre alla regione pre-core e core, anche segmenti genomici della regione pre-S e del gene S si sono rivelati critici per l'insorgenza di mutanti virali in grado di eludere l'immunoeliminazione. Mentre i mutanti core sembrano capaci di evadere la risposta di tipo cellulo-mediata, i mutanti dell'envelope sfuggono al riconoscimento mediato dagli anticorpi neutralizzanti.

Il determinante "a" costituisce l'epitopo immunodominante della proteina di superficie HBsAg e deriva da un regione genomica molto conservata, è infatti localizzato tra i residui 124 e 147 dell'*HBsAg* ed ha una struttura a doppia ansa. E' stato dimostrato che le cisteine in posizione 124 e 147 e la prolina in posizione 142 sono essenziali per la reattività antigenica²¹⁴ e di conseguenza sono incluse in sequenze molto conservate. Variazioni della struttura primaria del determinante "a" possono variare drasticamente la struttura antigenica conformazionale dell'*HBsAg*, tanto da permettere la selezione di *escape mutant* in grado di replicare anche in presenza di anticorpi neutralizzanti anti-HBs e di conseguenza di sfuggire alla risposta immunitaria²¹⁵.

Il mutante G145R rappresenta un prototipo di queste varianti virali. Tale mutazione è stata individuata in differenti Paesi, sia in pazienti sottoposti a trapianto di fegato trattati con gammaglobuline iperimmuni anti-epatite B, sia in bambini vaccinati²¹⁶.

Si tratta di una mutazione puntiforme con la sostituzione di una guanina con una adenina in posizione 587 del gene S che determina anche una sostituzione aminoacidica glicina con arginina a livello del determinante “a” dell’HBsAg. Questa mutazione comporta una modificazione delle caratteristiche antigeniche del determinante “a” incidendo sulla idrofobicità della sequenza, tenuto conto che l’arginina è un residuo aminoacidico di dimensioni maggiori rispetto alla glicina.

L’idrofobicità della sequenza, che spesso è correlata con l’antigenicità, risulta notevolmente aumentata in pazienti infettati con varianti virali *escape*.

La mutazione G145R non ha effetti sull’abilità di replicazione di HBV, il virus mutato riesce infatti ugualmente ad aderire agli epatociti. La mutazione è stabile poiché è isolabile anche dopo diversi anni di dall’infezione. Il virus mutato mantiene tutta la sua virulenza.

Sono state evidenziate altre mutazioni in grado di variare la sequenza di HBsAg, non solo in soggetti sottoposti ad immunoprofilassi, ma anche in portatori di HBV, tanto da sollevare dubbi sulla validità a lungo termine della vaccinazione ²¹⁷. A Taiwan è stato infatti riportato un aumento significativo dell’insorgenza di varianti HBV nei 10 anni successivi all’introduzione della vaccinazione universale ²¹⁸. Inoltre tramite l’utilizzo di modelli matematici, si è potuto stabilire come i virus mutati predomineranno sul *wild type* nell’arco di 90-100 anni. I metodi di diagnosi per la ricerca di HBsAg che si basano sull’utilizzo di anticorpi monoclonali, potrebbero non riuscire a determinare strutture antigeniche alterate dando esiti falsati. Da qui l’importanza di monitorare nel tempo la prevalenza e l’emergenza di nuove varianti virali di HBV al fine di valutare la necessità di nuove preparazioni vaccinali che includano proteine di superficie mutate.

Anche le regioni pre-S1 e pre-S2, essendo altamente immunogeniche, sono potenzialmente sottoposte alla pressione del sistema immunitario poiché esposte sulla superficie insieme all’HBsAg. Sono state infatti riconosciute numerose mutazioni puntiformi, ampie delezioni nella regione pre-S1 e altre delezioni in grado di inibire l’espressione dell’intera proteina pre-S2. Alcune mutazioni comportano l’eliminazione dei siti di riconoscimento da parte delle cellule B e T, senza però alterare il sito di legame agli epatociti in questo modo il virus sfugge alla risposta dell’ospite pur mantenendo la capacità di infettare nuove cellule e di indurre uno stato di infezione cronica ²¹⁹.

E' stato inoltre osservato come mutazioni nella regione preS/S inducano l'acquisizione di funzioni transattivanti, non presenti nel gene *wild type*, con la produzione di peptidi coinvolti nello sviluppo del carcinoma epatocellulare²⁰⁸.

MUTANTI DEL GENE DELLA POLIMERASI

Per eradicare l'infezione cronica da HBV, è necessaria una terapia antivirale prolungata e per tale motivo si assiste alla selezione di ceppi resistenti con mutazione nel gene della polimerasi virale, analogamente a quanto accade durante la terapia antivirale in corso di infezione da HIV²⁰⁶.

Il gene della polimerasi, nel genoma di HBV, si sovrappone al gene dell'*envelope*, di conseguenza mutazioni nel dominio catalitico del primo gene possono modificare la sequenza amminoacidica della proteina dell'*envelope* e viceversa, provocando così ulteriori conseguenze sul decorso dell'infezione²²⁰.

L'insorgenza di mutazioni a livello del gene della polimerasi di HBV è stata riscontrata in seguito a trattamento terapeutico antivirale con analoghi nucleosidici quali la Lamivudina, il Famciclovir e l'Adefovir.

La lamivudina (o 3TC) rappresenta un potente inibitore della DNA polimerasi RNA-dipendente di HBV e blocca la trascrizione inversa inibendo in questo modo la replicazione virale, riducendo in modo efficace la carica virale nei portatori cronici. Trattamenti a lungo termine possono però far sorgere resistenze, a seguito di alterazioni nel dominio altamente conservato YMDD (tiroxina, metionina, aspartato, aspartato). Mutazioni insorgono quando la metionina (M) è mutata in una valina (V) o in isoleucina (I). Le mutazioni più frequenti sono rappresentate dalle sostituzioni metionina/valina (M552V) o metionina/isoleucina (M552I) che portano entrambe alla sostituzione amminoacidica ai codoni 195 e 196 nel gene S, per sovrapposizione delle 2 ORF²²¹.

Spesso associata a queste mutazioni è L528M, la cui nuova nomenclatura la caratterizza come la rtL180M, mentre la M552V e la M552I sono indicate come la rtM204V e la rtM204I²²².

Altre mutazioni frequenti sono rappresentate dalla rtM202I/V spesso in associazione con la rtL178M. Risulta abbastanza frequente anche la V555I, la cui attuale denominazione risulta essere rtV207I.

Le mutazioni nel dominio YMDD possono alterare le proprietà della polimerasi virale, variandone la fitness. Per valutare le conseguenze di tali mutazioni sull'abilità replicativa e sulla suscettibilità alla lamivudina, sono state create 7 varianti della polimerasi virale sostituendo la metionina del dominio YMDD. Le prime 4 (YIDD, YVDD, YADD e YLDD) rimanevano competenti per la replicazione, mentre le YKDD, YRDD e YTDD mostravano una replicazione meno efficiente.

Inoltre la replicazione in presenza della lamivudina non era ridotta nelle varianti YIDD e YVDD, a differenza delle YADD e YLDD nelle quali la replicazione risultava ridotta¹⁶⁹. E' importante sottolineare come l'incidenza delle mutazioni nel motivo YMDD aumenti progressivamente con la durata del trattamento con lamivudina.

Diversi studi mostrano il 24% di ceppi HBV mutati ad 1 anno di terapia, il 47-56% a 2 anni fino a raggiungere una percentuale del 69-75% a 3 anni⁸¹.

Inoltre lo sviluppo di queste mutazioni è stato in particolare associato alla presenza di alcuni fattori di rischio quali il sesso maschile, la razza asiatica, l'immunosoppressione, il body mass index (BMI) ed un'elevata carica virale di HBV all'inizio del trattamento. L'insorgenza di mutanti YMDD si manifesta sia in individui in corso di terapia immunosoppressiva in seguito a trapianto di fegato sia in individui perfettamente immunocompetenti⁵⁸.

L'insorgenza di mutazioni durante il trattamento con la Lamivudina è solitamente associato con un innalzamento delle ALT nel siero, valore che si abbassa con il tempo suggerendo che il farmaco continua ad esercitare il suo effetto soppressivo¹⁶⁹.

Il Famciclovir è, a differenza, il pro-farmaco del penciclovir-trifosfato, un analogo nucleosidico che inibisce la DNA polimerasi, sia DNA che RNA-dipendente. Questo farmaco è utilizzato per il trattamento di pazienti con epatite cronica di tipo B ed in soggetti che hanno subito trapianto di fegato ortotopico. L'insorgenza di virus mutanti famciclovir-resistenti, è stata rilevata sia in pazienti immunodepressi quanto in soggetti immunocompetenti, sebbene mostri una frequenza più bassa rispetto a quella dei mutanti lamivudina-resistenti⁵⁸.

MUTANTI DEL GENE X

In pazienti con inusuali profili sierologici di infezione da HBV, sono state evidenziate mutazioni anche a livello del gene X.

Sono state descritte delezioni associabili ad una varietà di mutazioni puntiformi che possono tradursi in una mancata secrezione di proteine, quali l'HBsAg e l'HBeAg²¹⁷.

GENOTIPI RICOMBINANTI

La coinfezione di un paziente con due ceppi di HBV che appartengono a due genotipi differenti può causare lo scambio di materiale genetico tra di loro, dando luogo alla nascita di un ceppo ricombinante. Tuttavia, il meccanismo di questa ipotetica ricombinazione rimane enigmatico. Attualmente, non è stato proposto alcun meccanismo che spieghi lo scambio di materiale genetico tra due genomi hepadnavirali a livello di trascrizione¹⁶. Nonostante ciò, numerosi autori hanno descritto cambiamenti nel genoma di HBV che sembrano essere conseguenze di un evento ricombinante (Figura 10)¹⁶.

Due studi recenti hanno cercato di analizzare la prevalenza globale dei ceppi ricombinanti di HBV^{35, 36}. I risultati dimostrano che, in generale, i ceppi ricombinanti hanno la tendenza ad avere la stessa distribuzione geografica dei genotipi parentali. Circa l'87% dei ricombinanti presunti erano B/C e A/D. Altri ricombinanti comprendevano A/B/C, A/C, A/E, A/G, C/D, C/F, C/G, C/U (U per genotipo sconosciuto) e B/C/U. Genotipi A e C hanno dimostrato una tendenza maggiore per la ricombinazione rispetto ad altri genotipi.

I ceppi ricombinanti **B/C** sono stati trovati in Asia Orientale e del Sud^{108-109, 134-135}, i ceppi **A/D** sono descritti in Italia^{35, 134}, Sud Africa^{35, 136} e India³⁵, **A/C** in China³⁵, **C/D** in Tibet^{137, 138} e in China Nord-Occidentale³⁵, **A/E** in Cameroon^{35, 102}, **A/B/C** e **D/E/A** in Africa^{35, 106}, **C/G** in Thailanda^{35, 139}, **C/F** in Bolivia³⁵, **A/G** in America³⁵. Molto recentemente, un nuovo ceppo ricombinante **D/E** è stato identificato in Repubblica Centrafricana, In Irlanda (in un paziente proveniente dall'Africa Occidentale), in Tunisia e in Guinea, dove tutte le sequenze avevano lo stesso profilo ricombinante^{21, 131-133}.

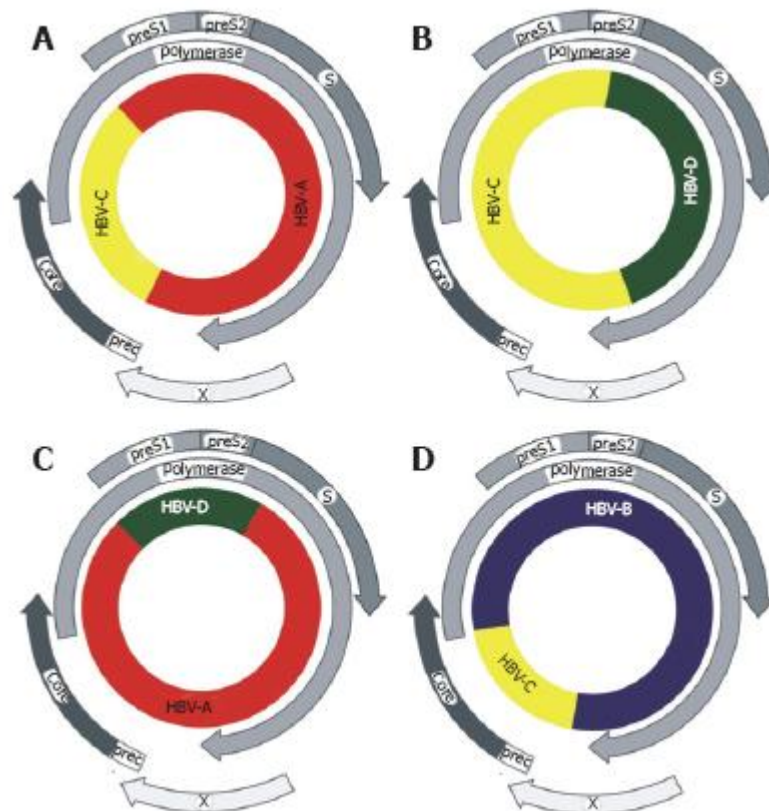


Figura 10. Presentazione schematica dell'organizzazione del genoma in ceppi ricombinanti tra vari genotipi di HBV ¹⁶. Gli isolati provengono da **A:** Vietnam ⁹¹; **B:** Tibet ¹³⁷; **C:** Africa ¹³⁶ and **D:** Asia ¹⁰⁸. Gli ORF sono segnati con le frecce; il ciclo interno rappresenta il genoma di HBV.

I risultati mostrano anche le regioni prioritarie e le posizioni dei nucleotidi che partecipano nella ricombinazione intergenotipica, che sono: preS1/S2 (nt 3150-100), la posizione terminale 3' del gene C (nt 2330-2450), la posizione terminale 3' del gene S (nt 650-830) e la regione fiancheggiante DR1 (nt 1640-1900) ^{35, 36}.

Sono descritte anche le ricombinazioni tra le sequenze di HBV umano e quello di scimpanzé (65) o gibbone ³⁶.

Alcuno dei ceppi ricombinanti intergenotipici hanno formato il sottogenotipo prevalente dominante in zone geografiche specifiche. La ricombinazione tra genotipi B e C hanno portato nello sviluppo di due ceppi diversi con distinte distribuzione geografiche ¹⁰⁸.

I ceppi di genotipo B senza ricombinazione sono stati trovati in Giappone (sottogenotipo B1), mentre i ceppi ricombinanti tra i genotipi B e C sono diffusi in Asia escludendo Giappone (sottogenotipo B2)¹⁰⁸. Il ceppo ricombinante di HBV tra genotipi C e D costituisce il sottogenotipo dominante di HBV in Tibet^{137, 138, 146}, anche se il genotipo D, che ha partecipato alla ricombinazione, si trova raramente in quell'area geografica.

Ci sono ancora dubbi sul fatto che l'evento di ricombinazione sia conseguenza di uno scambio diretto di materiale genetico tra i due ceppi di HBV, o conseguenza di un adattamento veloce di virus dell'epatite B in certe condizioni immunologiche e genetiche notate in popolazioni umani differenti. La capacità replicativa di HBV con il rilascio fino a 10^{13} particelle virali al giorno^{147, 148} e un coefficiente di errore della polimerasi virale alto, causano ogni giorno la produzione di genomi di HBV che, probabilmente, contengono mutazioni singole o doppie per ogni nucleotide¹⁴⁸. Per questo motivo, un eventuale adattamento veloce di HBV all'ambiente nuovo, deve essere preso in considerazione¹⁶. Questo può anche essere il caso del ceppo ricombinante HBV/DE descritto nel 2010 in Niger²⁵, classificato come sottogenotipo D8. Si suppone che la sua nascita è favorita dall'alta epidemia di HBV in Niger (la prevalenza dell'HBsAg è del 17.6-29.8%^{141, 142}, ed in un studio molto più recente è del 19.2%¹⁴⁰) e dalla coesistenza di genotipi differenti, D e E, nei paesi circostanti. Praticamente, il genotipo D è prevalente in Algeria, Marocco e Tunisia¹⁴³ che si trovano al nord del Niger, mentre il genotipo E è prevalente in Mali, Burkina Faso, Benin e Nigeria^{144, 145} che sono al confine con l'ovest e il sud del Niger.

La ricombinazione intergenotipica può dirigere a caratteristiche biologiche differenti del virus dell'epatite B ed ad un decorso clinico diverso nei pazienti³⁵. Ad esempio, il ceppo ricombinante B/C può influenzare la gravità clinica della malattia¹⁰⁸.

Sono stati inoltre descritti casi di ricombinazione intragenotipica. In uno studio di Simmonds & Midgley sono state descritte ricombinazioni all'interno dei genotipi A, D e F/H³⁶. Queste contribuiscono alla variabilità definita in ogni genotipo e, nello stesso tempo, possono ostacolare la comprensione della storia evolutiva di HBV¹⁴.

IMPLICAZIONI CLINICHE DEI FENOTIPI E GENOTIPI DI HBV

Le prime differenze sul piano clinico sono state riscontrate tra i sottotipi di HBV: studi condotti in Giappone hanno rilevato l'associazione del sottotipo *ayw* con la malattia di Gianotti¹⁶⁸ e una maggiore frequenza di alterazioni della funzionalità epatica nei soggetti presentanti il sierotipo *adr* rispetto a quelli infettati con *adw*.

Relativamente agli studi di comparazione clinica dei genotipi virali noti bisogna premettere che essi finora sono gravati dal limite di essere focalizzati sulla comparazione del genotipo B con C e del genotipo A con D, a causa della relativa distribuzione geografica.

Diversi studi condotti in Estremo Oriente suggeriscono una più severa evoluzione clinica nei pazienti infettati da genotipo C rispetto a quelli con genotipo B, e una più frequente associazione ad epatocarcinoma del genotipo C rispetto al B^{170, 171}.

In particolare, uno studio condotto a Taiwan¹⁷⁰ evidenzia la maggiore frequenza del genotipo C in caso di cirrosi e di epatocarcinoma in soggetti aventi più di 50 anni, e del genotipo B in soggetti più giovani e non cirrotici.

Occorre sottolineare che non è ancora ben conosciuto il meccanismo patogenetico che sta alla base della più severa prognosi dell'epatopatia cronica da genotipo C.

A questo proposito secondo alcuni studi, il genotipo C rispetto al genotipo B è caratterizzato da una maggiore latenza temporale necessaria per la sieroconversione ad anti-*e*; ciò, come spiegato precedentemente, comporta un'infezione cronica persistente con multipli episodi di riacerbazione e remissione che determinano una maggiore attività della patologia epatica^{172, 173}.

Per quanto riguarda i genotipi A e D, diffusi in Europa e in India, i dati su larga scala sono limitati.

Secondo uno studio condotto in Spagna i pazienti affetti da epatopatia cronica di genotipo A hanno maggiore probabilità di eliminare HBsAg e HBV-DNA, una migliore evoluzione clinica ed una minore mortalità da scompenso epatico rispetto a quelli infettati da genotipo D e F¹⁷⁴.

Questa osservazione è analoga a quella riportata in India, paese nel quale il genotipo D è risultato essere associato più frequentemente ad evoluzione cronica severa e alla degenerazione neoplastica in età giovanile rispetto al genotipo A ¹⁷⁵.

Alcuni genotipi sono stati associati ad andamento fulminante dell'epatite.

Uno studio condotto in Vietnam ha evidenziato una maggiore frequenza del genotipo B; in particolare all'interno di tale genotipo, i ceppi associati ad epatite fulminante differirebbero da quelli non associativi per una mutazione nel gene x ¹⁷⁶. Dall'analisi dei casi con epatite B acuta in U. S. è stata trovata una prevalenza alta di genotipo D ¹⁸⁴.

Negli altri paesi del mondo, diverse epidemie dell'epatite fulminante sono state causate da coinfezione tra genotipi differenti di HBV con il virus dell'epatite D (HDV); in America ⁵⁵ e in Africa ¹⁷⁷ è stata dimostrata la coinfezione di HDV con il genotipo F, mentre in Russia con il genotipo D ¹⁷⁸.

Per quanto concerne la risposta dei diversi genotipi di HBV alla terapia, i genotipi C e D sembrano essere più resistenti all'IFN α rispetto ai genotipi A e B ¹⁷⁹; probabilmente, la minore possibilità di risposta terapeutica è correlata al più rapido sviluppo di mutanti precoci caratteristici dei genotipi C e D.

Invece, non si conosce ancora l'influenza esercitata dal genotipo sulla risposta agli analoghi nucleosidici: uno studio mostra il rischio di resistenza alla lamivudina 20 volte maggiore in pazienti con genotipo A e C ¹⁸², ma è stato segnalato che con trattamenti superiori ai 2-3 anni, il rischio è ugualmente alto per tutti i genotipi ¹⁸³.

COINFEZIONE HBV – HIV

Poiché il virus dell'epatite B e HIV condividono le modalità di trasmissione, non stupisce il dato secondo cui più dell'80% dei pazienti sieropositivi per HIV presenti dei markers sierologici di attuale o pregressa infezione da HBV ¹⁸⁵; si stima inoltre che l'8-11% della popolazione sieropositiva per HIV sia affetta da epatopatia cronica da HBV.

L'impatto della coinfezione da HBV sulla storia naturale dell'infezione da HIV è ancora controverso.

HBV non è un virus puramente epatotropo ed è noto che possa infettare attivamente i linfociti¹⁸⁶; è stata segnalata un'interazione diretta con HIV legata all'interazione della proteina X di HBV con sequenze regolatrici di HIV che provocherebbe l'attivazione del provirus¹⁸⁷.

Tuttavia, solo due studi hanno suggerito l'ipotesi di un effetto sfavorevole della coinfezione con HBV sul decorso dell'infezione da HIV: il primo ha rilevato una più rapida progressione dell'infezione da HIV in pazienti con marcatori di infezione presente o passata da HBV, il secondo ha osservato una più elevata mortalità in pazienti affetti da AIDS conclamato in presenza di infezione cronica da HBV¹⁸⁸.

Altri studi non confermano tale influenza peggiorativa^{185, 191}.

Vi sono molte evidenze che la storia naturale dell'infezione da virus dell'epatite B sia modificata dalla coinfezione con HIV¹⁹².

Nei pazienti coinfecti è più frequente l'evoluzione cronica dell'infezione da HBV, si repertano livelli più elevati di replicazione del virus dell'epatite B, il tasso di sierconversione da HBeAg ad anti-HBe risulta inferiore ed è più frequente l'incidenza di riattivazioni nonostante la sierconversione ad anti-HBs¹⁹³.

Tale tipo di evoluzione è compatibile con la perdita del controllo immunitario della replicazione virale in seguito alla deplezione linfocitaria dovuta all'infezione da HIV¹⁹². Nonostante la persistente ed intensa replicazione virale, normalmente nei pazienti coinfecti i livelli degli indici di citolisi epatica sono inferiori rispetto ai pazienti con sola infezione da HBV: tale dato si spiega con il modello immunopatogenetico del danno epatico correlato all'infezione da HBV. Secondo questo modello i linfociti T citotossici, caratteristicamente depleti in corso di infezione da HIV, svolgerebbero un ruolo chiave nella clearance virale innescando la risposta infiammatoria responsabile della malattia epatica.

Nonostante ci siano dati a favore di una diminuita progressione della malattia epatica nei soggetti coinfecti, vi sono studi che indicano, al contrario, un significativo aumento della mortalità per malattia epatica in questa popolazione: 14.2/1000 vs 0.8/1000 rispetto ai pazienti infettati con il solo HBV; a ciò si associa spesso una aumentata progressione in cirrosi¹⁹⁴.

Tale trend verso l'evoluzione sfavorevole della malattia epatica è stata segnalato a partire dal 1996 quando è stata introdotta la HAART.

La più lunga aspettativa di vita associata all'assunzione della terapia antiretrovirale può permettere all'infezione da HBV di evolvere nella sua storia naturale a cirrosi, l'instaurarsi della quale può essere indotto, d'altro canto, dalle più frequenti riattivazioni della malattia epatica conseguenti all'immunoricostruzione causata dalla HAART.

Il danno epatico può essere inoltre aggravato dalla stessa tossicità intrinseca alla maggior parte dei farmaci antiretrovirali ¹⁹⁵.

INFEZIONE DA HBV IN ALBANIA

L'Albania è localizzata nel Sud-Est dell'Europa in penisola Balcanica. Al Nord è in confine con il Montenegro e Kosovo, all'Est con la Macedonia, al Sud con la Grecia ed all'Ovest con Mar Adriatico e Mar Ioniano. L'Albania ha una superficie pari a 28.750 km² ed è principalmente un paese montuoso con l'eccezione della pianura marittima all'Ovest (Figura 11).



Figura 11. Mappa geografica dell'Albania.

La popolazione ammonta a 3.069.275 abitanti. Il tasso di crescita e di natalità della popolazione sono in diminuzione iniziando dagli anni '60. Nonostante questo, Albania ha un livello di fertilità più alto nell'Europa Sud-Orientale ma più basso di quella della Turchia e Asia Centrale. Il tasso di crescita naturale è stimato in 20.000 persone/anno nel anno 2001 mentre il coefficiente sintetico di fertilità è pari a 1.4 bambini per ogni donna di età fertile ²²³. Questo significa che la popolazione in Albania sta cominciando ad invecchiarsi. Le ragioni sono emigrazione della popolazione in età fertile, aumento dell'età media di matrimonio, uso dei metodi di pianificazione familiare, etc.

La popolazione albanese è relativamente giovane con un età media di 32.8 anni (per i maschi è di 32.3 anni e per le femmine 33.3 anni). Il 46% della popolazione ha meno di 25 anni di vita e l'8% ha più di 65 anni di vita. Quest'ultima popolazione sta crescendo velocemente che vuol dire che la popolazione anziana sarà raddoppiata dopo 20 anni.

Nel 2006, l'aspettativa di vita alla nascita è di 77.2 anni per il sesso femminile e 72.4 anni per quello maschile. Le cause maggiori della morte sono: malattie del sistema cardiocircolatoria, neoplasmi, senilità, traumi e avvelenamenti, malattie del sistema respiratoria, etc. La mortalità infantile per i bambini sotto i 5 anni è stato stimato pari a 33 morti/1000 nati vivi nell'anno 2000 ²²⁷.

Albania è affetto da un'emigrazione esterna soprattutto durante il periodo 1990-1999 dove ci sono emigrati più di 750.000 persone in Italia, Grecia ed altri paesi della Comunità Europea ²²⁴, e dall'emigrazione interna da zone rurali in quelle urbane iniziata nel 1990. Nel 2004, il 45% della popolazione vive in città mentre il 55% nelle zone rurali. Nella capitale dell'Albania, a Tirana, la popolazione è cresciuta rapidamente con più di 500.000 di abitanti. Nel 2001, il regione di Tirana aveva un quinto della popolazione totale. All'inizio del 1999 a seguito della guerra in Kosovo, si è verificato una migrazione di più di 700.000 Kosovari e 400.000 di quali hanno chiesto asilo in Albania. Questi movimenti della popolazione hanno causato danni considerevoli nell'infrastruttura e nel sistema sanitaria ²²⁵.

Il 97% della popolazione sono Albanesi etnici. Altre etnie sono quella Greca con 66.000 abitanti al Sud dell'Albania, del Macedonia con 8000 abitanti in Sud-Est, del Montenegro con 1200 abitanti al Nord, dei Rom e Arumuni.

Il 70% della popolazione è di religione musulmana, il 20% ortodossia e il 10% cattolica. Questi dati riflettono solo “l’origine della religione” perché, da tanto tempo, la religione non è un elemento importante dell’identificazione nella società albanese ²²⁶.

L’Albania è un paese ad alta endemia per HBV con un numero notevolmente alto di pazienti con epatite cronica e carcinoma epatocellulare ²⁹, a differenza dei paesi che si trovano al confine quali Italia ¹⁸¹ e Grecia ¹⁹⁸ che variano da bassa ad intermedia endemia, e Kosovo ^{19, 53}, Macedonia e Montenegro ²⁰³ che fanno parte dei paesi ad endemia intermedia.

Gli studi effettuati sugli immigranti albanesi in Italia e Grecia descrivono valori molto alti di prevalenza dell’HBsAg che variano da 19% a 22.2% in 1993 ⁵² e 1995 ¹⁹⁸ e che, successivamente diminuiscono a 13.4%-13.6% nel periodo 1996-2003 ^{199, 51, 200}. Viene anche sottolineata una prevalenza di 8.1% nei bambini al di sotto a 10 anni ⁵¹.

Le cause dell’endemicità molto alta per l’HBV prima dell’anno 1995 sono da attribuire alla povertà e scarsa igiene, condizioni di sovraffollamento, uso dell’attrezzature medicinali vecchie, riduzione degli investimenti finanziari in sistema sanitaria nel 1980 ²²⁸, assenza di aghi e siringhe monouso, mancanza del sangue sicuro ed i suoi prodotti per transfusione, sterilizzazione inadeguata delle attrezzature riutilizzabili, difficoltà di procurare il materiale necessario per la prevenzione dell’esposizione al sangue e alla mancanza di un programma di immunizzazione contro l’HBV ⁴⁷.

Nel maggio 1995, l’Albania introduce nel Programma Nazionale di Immunizzazione la vaccinazione obbligatoria contro l’HBV per tutti i neonati, come una strategia appropriata per ridurre il livello di infezione da HBV ed epatite cronica HBV-correlata. I neonati sono stati vaccinati alla nascita, e successivamente il 2° e il 6° mese di vita. La vaccinazione per i gruppi a rischio è iniziata dopo il 2000, mentre la campagna di massa per la vaccinazione di soggetti esposti a rischio professionale è iniziata solo dopo l’anno 2002 ⁵⁰.

Un indicatore del successo di tale programma nell’interruzione della trasmissione di HBV è stata la significativa riduzione dell’incidenza annuale dell’epatite acuta B in Albania, da 692 casi nel 2000, a 348 nel 2005 ²⁰².

Da studi effettuati durante il periodo 2004-2009 emerge che la prevalenza dell’HBsAg nella popolazione generale in Albania è diminuita rispetto a circa 10 anni fa, del 11.89%

in giovani ⁴⁰, 10% ²⁰¹, 9.5% ⁴⁷ e 9.8% in donne gravide ²⁰⁵. Secondo Katsanos et al., solo il 21.19% dei giovani di età compresa tra i 14 e 20 anni ha un livello protettivo degli anticorpi anti-HBs, che vuol dire, una situazione ancora alarmante di HBV tra i giovani albanesi ⁴⁰. La prevalenza dell'HBV in soggetti esposti a rischio professionale è di 8.1% ⁵⁰. In circa 85 pazienti con epatite cronica B è stato trovato il genotipo D e il ceppo prevalente è HBeAg negativo che presenta la mutazione G1896A nella regione pre-core ^{39,43}.

Altre cause della riduzione di prevalenza di HBsAg nella popolazione generale vaccinata e non-vaccinata, a parte la vaccinazione obbligatoria dei neonati contro l'HBV, sono ⁴⁷:

- il miglioramento delle misure generali di prevenzione quali:
 - uso delle procedure sicure di iniezioni
 - la sterilizzazione corretta di attrezzature dentali e medicali
 - lo screening appropriato del sangue ed i suoi derivati
 - lo sviluppo di un'educazione sanitaria
- prevenzione della trasmissione perinatale di HBV in bambini nati da madri HBsAg positivo
- prevenzione della trasmissione orizzontale nella prima infanzia
- la vaccinazione contro l'HBV di gruppi di rischio come:
 - soggetti esposti a rischio professionale
 - pazienti talassemici
 - pazienti in emodialisi.

Se il tasso di eliminazione di HBV dovesse continuare con gli stessi ritmi finora osservati, si potrebbe realmente prevedere che a partire dal 2020, Albania possa entrare a far parte dei paesi ad endemia intermedia. Tuttavia, l'Albania resta attualmente, la maggior priorità della sanità pubblica nei Balcani dell'Ovest e necessita urgentemente di politiche sanitarie preventive di carattere nazionale con il supporto della Organizzazione Mondiale della Sanità e la Comunità Europea ⁴⁰.

La situazione dell'infezione da HBV in Kosovo cambia in modo significativo rispetto a quella dell'Albania, ma è molto simile a Macedonia, Bosnia-Herzegovina e Bulgaria ²⁰³. Il Kosovo è un paese ad endemia intermedia con la prevalenza dell'HBsAg pari a 2.9% e 2.4% in due studi rispettivi in 2001 ⁵³ e 2008 ¹⁹. Nei bambini al di sotto di 10 anni,

la prevalenza dell'HBV è 0.4%⁵³. L'infezione si diffonde nella popolazione tramite la trasmissione sessuale, parenterale ed orizzontale. Prima della crisi Balcanica, in Kosovo non esisteva nessun programma di vaccinazione contro HBV. Attualmente, la vaccinazione viene praticata in diverse zone del Kosovo ma non è ancora standardizzata. I soggetti esposti a rischio professionale risultano essere più vaccinati contro HBV rispetto ad altri gruppi di rischio¹⁹.

MATERIALI E METODI

POPOLAZIONE IN STUDIO

SOGGETTI ALBANESI

Nell'ambito del progetto di ricerca sono stati analizzati 73 soggetti caratterizzati dalla positività per l'antigene di superficie (HBsAg), in presenza o meno di sintomi clinici. Tutti questi soggetti sono negativi per la presenza di anticorpi anti HCV e anti HIV-1, tranne due pazienti con coinfezione HBV/HIV-1.

I campioni di siero provengono da due istituzioni diverse di Tirana, in Albania: 36 campioni fanno parte di uno studio precedente effettuato presso l'Istituto di Sanità Pubblica nel 2005 comprendente soggetti ad alto rischio di infezione come tossicodipendenti (IVDUs) e omosessuali maschi (MSM), ma anche individui senza particolari rischi di esposizione all'infezione come i Rom. Gli altri 37 campioni di siero, prelevati durante il periodo giugno-settembre 2007, provengono dal Centro Nazionale di Trasfusione del Sangue ed si dividono in soggetti senza particolari rischi di esposizione all'infezione ed in soggetti esposti a rischio professionale (HCW).

Tutti i campioni sono stati conservati a -20°C. Questi campioni sono stati trasferiti e successivamente analizzati presso Laboratorio di Malattie Infettive e Tropicali, Dipartimento di Scienze Cliniche L. Sacco dell'Università degli Studi di Milano.

Nello studio sono compresi 57/73 maschi (78%) e 16/73 femmine (22%) di diverse fasce di età (Figura 12).

Per 28/73 (38%) soggetti non sono noti i rischi di esposizione ad HBV e questi sono classificati come popolazione generale; 13/73 (18%) soggetti sono Rom, mentre i restanti sono suddivisi in 3 gruppi a rischio:

Soggetti esposti a rischio professionale (HCW)	9/73 (12%)
Tossicodipendenti (IVDUs)	13/73 (18%)
Omosessuali maschili (MSM)	10/73 (14%).

Per tutti i soggetti in studio è stata effettuata la raccolta dei dati anagrafici ed anamnestici.

Circa il 95% della popolazione in studio appartiene alla regione di Tirana.

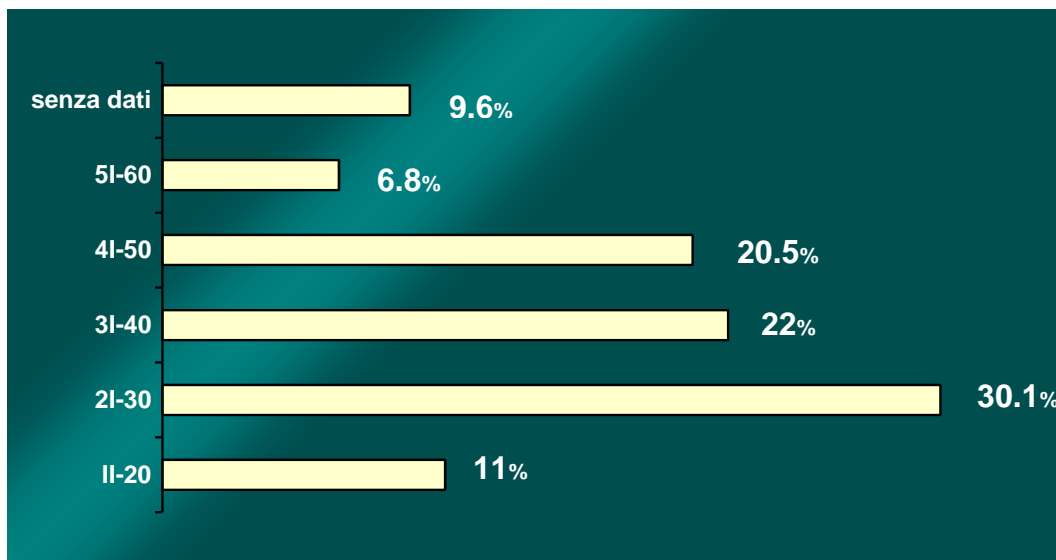


Figura 12. La divisione dei soggetti secondo le diverse fasce di età.

SOGGETTI ITALIANI

Sono stati analizzati, mediante uno studio retrospettivo (dal 1980 al 2007), campioni di siero/plasma provenienti da 230 soggetti con epatite cronica di tipo B, tutti HBsAg positivi.

In particolare, lo studio include 39 soggetti con coinfezione HBV/HIV-1 e 191 con sola epatite cronica da HBV.

I 39 soggetti con coinfezione HBV/HIV-1 sono 29 maschi (81,8%) e 10 femmine (18,2%) con età media di 42.6 anni (range 23-80 anni) di cui 34 (87.2%) di nazionalità italiana e 5 (12.8%) di nazionalità extraeuropea. Di questi, 13 (33.3%) facevano uso di droghe per via iniettiva, 14 (35.9%) erano omosessuali o bisessuali, comprendendo in questo gruppo anche 1 soggetto transessuale, 10 (25.6%) riferivano contatti eterosessuali a rischio, 1 (2.6%) aveva ricevuto trasfusioni di emoderivati e in 1 caso (2.6%) il rischio non era noto.

Per quanto concerne i 191 soggetti con sola infezione cronica da HBV, la possibile via di esposizione era ipotizzabile solo in 49 casi (25.6%): 15 soggetti (7.8%) riferivano l'uso di

droghe per via iniettiva, 11 (5.7%) mostravano comportamenti omosessuali o bisessuali, 12 (6.3%) riportavano comportamenti eterosessuali a rischio, 11 (5.8%) avevano ricevuto trasfusioni di emoderivati. Questi soggetti, di cui 121 maschi (63.3%) e 70 femmine (36.7%) con età media di 49.2 anni (range 13-84 anni), erano per la maggioranza (98.3%) di nazionalità italiana, ad eccezione di 3 individui (1.7%) di nazionalità extraeuropea (Tabella 3).

		<u>HIV-1 positivi</u>	<u>HIV-1 negativi</u>	<u>Totale</u>
SESSO	M	<u>29 (81.8%)</u>	<u>121 (63.3%)</u>	<u>150 (65.2%)</u>
	F	<u>10 (18.2%)</u>	<u>70 (36.7%)</u>	<u>80 (34.8)</u>
<i>p</i>		=	<u>0.1 (n.s.)</u>	=
<u>Età (X)</u>		<u>42.6 (DS)</u>	<u>49.2 (DS)</u>	<u>45.9 (DS)</u>
<i>p</i>		=	<u><0.001</u>	
<u>Nazionalità</u>				
<u>Italiana (%)</u>		<u>34 (87.2%)</u>	<u>188 (98.3%)</u>	<u>222 (96.5%)</u>
<i>p</i>		=	<u>0.3 (n.s.)</u>	

M:maschi; F:femmine; p:significatività statistica; DS:deviazione standard; X:media

Tabella 3. Caratteristiche anagrafiche dei 230 pazienti HBV positivi inclusi nello studio.

DATA SET

Comprende 123 sequenze di quale 58 sono albanesi e 65 italiane, tutte di genotipo D.

METODI

MODALITA DI RACCOLTA, PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il prelievo del sangue periferico e lo stoccaggio del siero è stata realizzata presso l'Istituto di Sanità Pubblica ed il Centro Nazionale di Trasfusione del Sangue a Tirana, in Albania.

I prelievi di sangue periferico sono stati effettuati in sterilità mediante sistema vacutainer e sono state utilizzate provette dotate di cuscino separatore, senza anticoagulante.

Il sangue (7 ml) è stato quindi centrifugato a 3500 x g per 5 minuti a 4°C. Il siero così ottenuto è stato suddiviso in aliquote da 1 ml e quindi congelato a -20°C.

Successivamente, i campioni di siero sono stati trasportati in ghiaccio secco presso il Dipartimento di Scienze Cliniche L. Sacco, Sezione di Malattie Infettive e Immunopatologia dell'Università degli Studi di Milano e rimessi nel freezer in temperatura di -20°C fino al momento dell'utilizzo.

ESTRAZIONE DEL DNA

L'estrazione del DNA è stata condotta a partire da siero/plasma mediante l'utilizzo di un kit commerciale della Roche (*High Pure PCR Template Preparation Kit*). Si tratta di un metodo semplice che consente la purificazione di DNA totale o inibitori e che quindi può essere sottoposto direttamente a PCR o ad altre reazioni enzimatiche.

La procedura di estrazione viene condotta usando apposite colonnine contenenti una membrana a fibre di vetro ad elevata affinità per gli acidi nucleici; durante le diverse fasi di centrifugazione, effettuate in una microcentrifuga standard, il filtrato viene raccolto in appositi tubi collettori da 2 ml.

Le fasi della procedura di estrazione eseguita su i campioni in esame sono le seguenti:

- In una provetta sterila da 1,5 ml aggiungere a 300 µl di siero, un ugual volume di tampone di lisi (*Binding Buffer*) e 50 µl di Proteinasi K (20 mg/ml). Dopo aver miscelato, incubare per 10 minuti a 72°C. La Proteinasi K digerirà le proteine sieriche/plasmatiche, mentre il *Binding Buffer* contenente guanidina 6 molare contribuirà alla denaturazione delle proteine e consentirà successivamente il legame specifico del DNA alla membrana, grazie ad una opportuna concentrazione di sali
- Aggiungere al campione 150 µl di isopropanolo e miscelare per qualche secondo. Quindi trasferire l'intero volume del campione nelle apposite colonnine inserite in tubi di raccolta. Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto e trasferire la colonnina in un tubo di raccolta nuovo, eliminando il filtrato. A questo punto il DNA è legato alla membrana
- Aggiungere 750 µl di *Removal Buffer* e centrifugare ulteriormente per 1 minuto a 8000 rpm; trasferire la colonnina in un tubo di raccolta nuovo. L'isopropanolo ed il *Removal Buffer*, che contiene etanolo, hanno la funzione di purificare accuratamente il DNA
- Effettuare due lavaggi consecutivi con 750 µl di tampone di lavaggio contenente etanolo assoluto (*Wash Buffer*) centrifugando sempre di 1 minuto a 8000 rpm e cambiando ogni volta le provette di raccolta. Tali condizioni di lavaggio assicurano la completa rimozione degli eventuali contaminanti residui senza influenzare il legame col DNA
- Centrifugare a vuoto per 10 secondi alla massima velocità per rimuovere tutto l'etanolo che potrebbe inibire le successive reazioni e trasferire la colonnina in una provetta sterile da 1,5 ml. Infine il DNA viene eluito in 50 µl con acqua sterile, scaldata a 70°C, mediante una centrifugazione finale a 8000 rpm per 1 minuto.

L'eluato, trasferito in provette da 1.5 ml, viene conservato a 4°C fino al momento dell'utilizzo; eventualmente mantenuto a -30°C per conservazione a lungo termine.

Al fine di escludere la possibilità di contaminazioni tra i diversi campioni, ogni estrazione di DNA dei pazienti in studio è avvenuta in parallelo con identico materiale biologico proveniente da donatori sani (controlli negativi di estrazione).

Inoltre, per escludere l'eventuale presenza di inibitori o un errore durante il procedimento di estrazione, è stato sempre utilizzato anche un controllo HBV-DNA-positivo noto.

AMPLIFICAZIONE DEL DNA VIRALE IN REGIONE PRE-S/S E P MEDIANTE NESTED-PCR

In seguito all'estrazione di DNA si effettua l'amplificazione tramite nested-PCR. Tale tecnica è una variazione della PCR classica e prevede due reazioni di amplificazione successive utilizzando due diverse coppie di *primer*.

Usando un nested-PCR più complesso abbiamo amplificato tre frammenti parzialmente sovrapposti che coprono quasi completamente la regione genomica (parziale *pre-S1*, *pre-S2* e S completi) e di conseguenza anche una porzione consistente del gene P di HBV, essendo le ORF di S e P sovrapposte.

Il kit usato si chiama *GoTaq[®] Hot Start Polymerase* della Promega.

Questa reazione di nested-PCR si avvale dei due successivi cicli (step) di amplificazione:

PRIMO STEP

Questa prima reazione di PCR consente di amplificare 2 diversi frammenti della regione *pre-S/S* e P, rispettivamente di 911 e 907 pb, in presenza delle seguenti coppie di *primers* esterni:

1° frammento (911 pb: nt 2960-655)

senso (HBV-7: nt 2960-2980): 5'-A(AG)T CC(AC) GAT TGG GAC (CT)(AT)C AA-3'

antisenso (ERS-IN3: nt 655-637): 5'-TGA GGC CCA CTC CCA TAG G-3'

2° frammento (907 pb: nt 202-1108)

senso (HBV-9: nt 202-220): 5'-GGC GG(GT) GT(GT) TTT CTT GTT G-3'

antisenso (HBV-6: nt 1108-1085): 5'-AAG TTG GCG A(AG)A A(AG)(AG) (CT)(AG)A AAG CCT-3'

Nel primo step di questa PCR, vengono preparati 2 diverse mix di PCR per ciascun frammento, utilizzando i primers senso e antisenso rispettivi:

Reagente	Volume per campione
H ₂ O sterile	21.7 µl
Buffer 5X colorless	10 µl
dNTP (2.5 mM)	4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
Primer senso (50 pmoli/µl)	0.5 µl
Primer antisenso (50 pmoli/µl)	0.5 µl
GoTaq Polymerase (5u/µl)	0.3 µl
Volume finale	40.0 µl

A questa mix si aggiungono 10 µL di DNA virale estratto ed il tutto viene sottoposto ad amplificazione in un termociclatore così impostato:

Temperatura	Tempo	N° cicli	Processo
95°C	9'	1	Attivazione Taq
95°C	45''	45	Denaturazione DNA
57.5°C	45''		Legame dei primer
72°C	1'30''		Estensione
72°C	10'	1	Estensione finale
4°C	∞		Conservazione

SECONDO STEP

Attraverso il secondo step di PCR vengono amplificati tre diversi frammenti, parzialmente sovrapposti tra loro, il primo dei quali, di 536 pb, interno al primo frammento ottenuto dalla PCR esterna di 911 pb (nt 2960-655), ed i rimanenti, di 476 e 700 pb, interni al secondo frammento di 907 pb prodotto dal primo step della nested-PCR (nt 202-1108).

Allo scopo sono state utilizzate coppie di *primers* differenti per i tre frammenti amplificati:

1° frammento (536 pb: nt 2960-280)

senso (HBV-7: nt 2960-2980): 5'-A(AG)T CC(AC) GAT TGG GAC (CT)(AT)C AA-3'

antisenso (HBV- 4: nt 280-257): 5'-TAG AAA ATT GAG AGA AGT CCA CCA-3'

2° frammento (476 pb: nt 180-655)

senso (HBV-5: nt 180-203): 5'-TAG GAC CCC T(GT)C TCG TGT TAC AGG-3'

antisenso (ERS-IN3: nt 655-637): 5'-TGA GGC CCA CTC CCA TAG G-3'

3° frammento (700 pb: nt 409-1108)

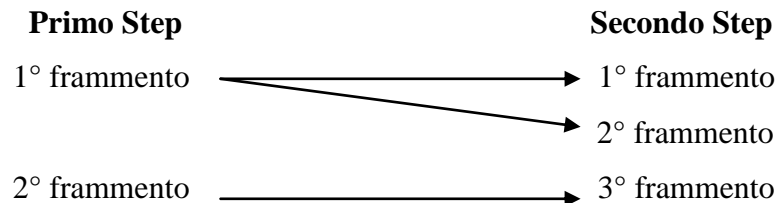
senso (ERS-IN2: nt 409-428): 5'-CAT CCT GCT GCT ATG CCT CA-3'

antisenso (HBV-6: nt 1108-1085): 5'-AAG TTG GCG A(AG)A A(AG)(AG) (CT)(AG)A AAG CCT-3'

Le 3 mix diverse di PCR sono state composte così:

Reagente	Volume per campione
H ₂ O sterile	25.8 µl
Buffer 5X green	10 µl
dNTP (2.5 mM)	4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
Primer senso (50 pmoli/µl)	0.5 µl
Primer antisenso (50 pmoli/µl)	0.5 µl
GoTaq Polymerase (5u/µl)	0.2 µl
Volume finale	44.0 µl

A queste mix si aggiungono 6 µL di amplificato del primo step secondo questa schema:



L'amplificazione del 1° frammento avviene in termociclatore alle seguenti condizioni:

Temperatura	Tempo	N° cicli	Processo
95°C	9'	1	Attivazione Taq
95°C	40''	45	Denaturazione DNA
55°C	40''		Legame dei primer
72°C	1'20''		Estensione
72°C	10'	1	Estensione finale
4°C	∞		Conservazione

Il profilo di amplificazione del 2° e del 3° frammento è il seguente:

Temperatura	Tempo	N° cicli	Processo
95°C	9'	1	Attivazione Taq
95°C	45''	45	Denaturazione DNA
59°C	45''		Legame dei primer
72°C	1'30''		Estensione
72°C	10'	1	Estensione finale
4°C	∞		Conservazione

Tutte le PCR effettuate nel corso dello studio comprendevano dei controlli interni negativi e positivi, nonché un campione bianco (non contenente DNA), ai fini di validare ogni singola corsa.

RILEVAMENTO DEI PRODOTTI DI PCR

Il rilevamento dei prodotti di amplificazione è stata ottenuta mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1,5% in tampone TAE 1X.

La migrazione del DNA su gel di agarosio dipende dalla lunghezza del frammento (FR) di DNA analizzato rispetto alla concentrazione dell'agarosio stesso.

Le bande di DNA sono state esaminate esponendo il gel alla luce ultravioletta, previa incorporazione nel gel stesso di un colorante fluorescente, etidio bromuro (0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), che si intercala tra le basi dell'acido nucleico.

Procedura:

- Sciogliere l'agarosio (1,5%) ad alta temperatura (70-80°C) in tampone TRIS-acetato EDTA (TAE) 1X (100ml)
- Incorporare l'etidio bromuro (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nel gel alla concentrazione finale di 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Una volta aggiunta la temperatura di circa 50°C, versare il gel nell'apposita vaschetta approntata per la corsa elettroforetica sulla quale è inserito un pettine che serve per formare i pozzetti
- Lasciare polimerizzare il gel a temperatura ambiente per 15-20 minuti
- Porre il gel nella vaschetta elettroforetica contenente TAE 1X
- Caricare 10 μl di DNA da ogni campione (il DNA contiene già il colorante proveniente dalla mix di PCR quale consente di seguire visivamente l'andamento della corsa)
- Condurre la corsa elettroforetica a 90 mV/cm in TAE 1X (Figura 13).

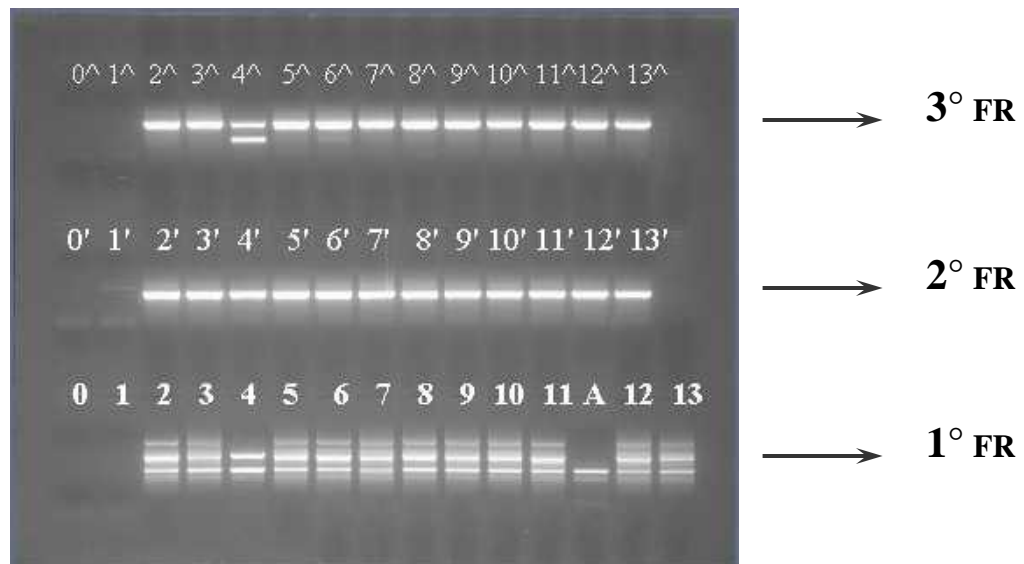


Figura 13. Rilevamento dei prodotti di amplificazione. Nested-PCR dei tre frammenti della regione pre-S/S.

PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR

I campioni risultati HBV-DNA positivi mediante le diverse reazioni di PCR in regione *pre-S/S*, *P* sono stati sottoposti a purificazione tramite l'impiego di un reagente commerciale di purificazione chiamato *microCLEAN* della *Labogen*. MicroCLEAN permette di purificare il DNA a doppia elica dai sali, dai primers, dai dNTPs in eccesso e dall'enzima Taq DNA-polimerasi.

Si tratta di un protocollo semplicissimo e veloce che prevede i seguenti passaggi:

- Aggiungere al DNA un pari volume di microCLEAN
- Miscelare con la pipette
- Lasciare a temperatura ambiente per 5 minuti
- Centrifugare ad alta velocità (13000 rpm) per 7 minuti
- Rimuovere il sovrantante
- Centrifugare brevemente e rimuovere i residui.

L'amplificato così purificato viene successivamente eluito in un volume di 25-50 μ l di H₂O bidistillata, a seconda della concentrazione iniziale del DNA.

Una miscela di 12 μ l composta da:

- 8 μ l di purificato
- 2 μ l di colorante
- 2 μ l di H₂O bidistillata

viene successivamente analizzata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% per confermare la presenza del prodotto di PCR e valutarne la concentrazione secondo l'intensità della banda rilevata su gel.

Il DNA purificato deve essere conservato a 4°C.

REAZIONE DI SEQUENZA

Il sequenziamento dei prodotti di PCR è condotto con la tecnica del *cycle sequencing*; in questa variante della PCR, il DNA viene amplificato con una DNA polimerasi

termostabile a partire da un unico primer di sequenza, in presenza di dideossiribonucleotidi (ddNTPs) marcati con fluorocromi.

I dideossiribonucleotidi sono definiti terminatori in quanto mancano del gruppo idrossile in 3', coinvolto nella formazione del legame fosfodiesterico tra i nucleotidi che costituiscono le molecole di DNA; la loro incorporazione al posto dei normali deossiribonucleotidi (dNTPs) nella catena nascente del DNA, determina l'arresto della reazione di polimerizzazione.

Il rapporto di concentrazione tra ddNTPs e dNTPs è calcolato in modo che la polimerasi termini la catena nascente in ogni posizione in cui il nucleotide può essere inserito, formando così una serie di frammenti sfasati e marcati in 3', che condividono tutti l'estremità del primer.

L'utilizzo di un enzima termostabile permette di svolgere l'attività di polimerizzazione del DNA ad alte temperature, minimizzando i problemi causati dalla formazione di strutture secondarie del DNA, di legami aspecifici e da interazioni fra i primer. Inoltre, come nella normale PCR, l'enzima resiste alla denaturazione quando la miscela di sequenziamento è incubata a 96° C, permettendo la realizzazione dei cicli successivi di estensione.

MISCELA DI REAZIONE E CICLI DI SEQUENZIAMENTO

Per l'estrazione di DNA si utilizzano 6 diversi primer: 3 senso HBV-7, HBV-5, ERS-IN2 e 3 antisenso HBV-4, ERS-IN3, HBV-6.

La miscela di reazione contiene i reagenti sottostanti con i volumi calcolati per un campione:

BigDye	1.1 µl
Primer (1 pmoli/µl)	3.2 µl
H ₂ O bidistillata	<u>1.7 µl</u>
	6 µl
+	
DNA purificato diluito	<u>4 µl</u>
Volume finale	10 µl

Il profilo termico di amplificazione per sintetizzare i frammenti di sequenza è il seguente:

Temperatura	Tempo	N° cicli	Processo
96°C	1'30''	1	Attivazione BigDye
95°C	20''	25	Denaturazione DNA
55°C	20''		Legame dei primer
60°C	3'		Estensione dei primer
4°C	∞		Conservazione

PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI SEQUENZA

La purificazione dei prodotti di sequenza si effettua utilizzando la precipitazione in etanolo con sodio acetato.

Il protocollo prevede i seguenti fasi:

- 10 µl di sequenza da purificare vengono miscelati con 50 µl di etanolo al 100% e 2 µl di sodio acetato (3 M, pH=5.2)
- Centrifugare per 30 minuti a velocità massima
- Rimuovere il surnatante e aggiungere 250 µl di etanolo al 70%
- Centrifugare per 5 minuti a velocità massima
- Rimuovere tutto l'etanolo servendo anche di un'ulteriore centrifuga di 1 minuto a velocità massima
- I pellet sono portati a secco incubando a 95°C per 4 minuti
- Conservare il pellet a -20°C.

SEQUENZIAMENTO

E' stato utilizzato il sequenziatore automatico *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems Inc.*), basato sulla tecnologia dell'elettroforesi capillare. La parte più importante di questo sistema è una unità intercambiabile composta da sedici capillari in silice fusa; questi, una volta riempiti di polimero, permettono la separazione elettroforetica dei frammenti di DNA marcati.

Si utilizzano 2.2 µl di campione, dopo averlo risospeso il pellet in 10 µl di acqua

bidistillata, che si aggiungono a 8 μ l di una soluzione denaturante di formammide.

I campioni vengono caricati in piastre da novantasei pozzetti, da cui sono prelevati, in gruppi di sedici, e spinti tramite iniezione elettrocinetica nei capillari; qui un circuito ad alto voltaggio fa migrare i frammenti di DNA, carichi negativamente, verso l'anodo.

La presenza del polimero all'interno dei capillari induce un rallentamento nella corsa delle molecole di DNA, proporzionale alla loro lunghezza; in tal modo queste si separano secondo la loro dimensione e, spinte attraverso una camera di conta, vengono colpite da un laser che ne eccita i marcatori. La fluorescenza viene rilevata da un dispositivo ad accoppiamento di carica (CCD) che trasforma i segnali luminosi in forma digitale, trasmettendo l'elettroferogramma ottenuto ad un Personal Computer, collegato direttamente all'apparecchio. Ogni corsa ha una durata di 3,5 ore impostando il sequenziatore con i seguenti valori: voltaggio 12,2 KV, corrente 67-77 mA, laser 15 mW e temperatura 50°C.

ANALISI DEI DATI DI SEQUENZA

L'analisi dei dati si esegue utilizzando il *Software Sequence Navigator (Applied Biosystems)*, che permette di allineare le sequenze ottenute dai diversi primer, assemblare una sequenza consenso utilizzabile per le analisi successive, tradurla in aminoacidi e confrontarla con una sequenza di riferimento, in modo da ottenere la successione corretta di basi azotate delle sequenze dei campioni in studio per poter effettuare in un secondo momento l'analisi filogenetica.

ANALISI FILOGENETICA

Il montaggio e l'elaborazione delle sequenze sono stati effettuati utilizzando il programma *Sequence Navigator*, incluso nel pacchetto di programma del sequenziatore.

Tutte le sequenze sono state poi analizzate mediante il software BioEdit *vs* 7.0.9.1 (*Tom Hall, 2001*), contenente il programma CLUSTAL W ¹⁸⁹ che ci ha consentito di allineare le sequenze nucleotidiche in studio con 61 sequenze di riferimento specifiche per diversi

sottogenotipi di HBV ottenute dalle principali banche dati, quali la *GenBank* presso il *National Center for Biotechnology Information* (USA- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Le sequenze di riferimento sono le seguenti:

- sottogenotipo A1: AF297621, AF418682, M57663, U87742, AF418674, Y161140
- sottogenotipo A2: HBVA317, S50225, HBVADW, HBVADW2, HBVXCPS, Z35717, AF143298, AB064314, AJ309371
- sottogenotipo A3: AB194950, AB194951, AB194949, AB194952
- sottogenotipo D1: Y07587, M32138, X02496, AF151735, AF280817, AJ344116, AY161150, AY161157, AY161161
- sottogenotipo D2: Z35716, AB078032, X72702, AB090269, AB090268, AB090270, AB078033, X80925, AY090453, AY090452
- sottogenotipo D3: X85254, HBVAYWC, HBJAYW
- sottogenotipo D4: X68292, AB048703, AB033558, AB033559, X65259, AB048701;
- sottogenotipo F1: 1980Nic, 70H, AY090459, AF223963
- sottogenotipo F2: 1889Nic, X69798, AB036910, AB036908, X75663, sa4, sa16, AB036919, AB036905, HHVBFFOU.

L'analisi filogenetica è stata effettuata utilizzando i programmi PHYLIP *versione 3.67*¹⁶³ e MEGA *vs 4.0.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)*⁴⁵.

In particolare per la scelta del modello di calcolo delle distanze genetiche, abbiamo effettuato preventivamente la stima del rapporto delle transizioni (mutazioni quali purina-purina o pirimidina-pirimidina) rispetto alle trasversioni (mutazioni del tipo pirimidina-purina e purina-pirimidina), mediante i programmi PAUP *vs 4.0b10 (da Swofford D., 2001, Sinauer Ass. Inc. Publ)* e Modeltest *vs 3.7*¹⁸⁰ o Phym1 3.0²⁰⁷, che consentono di scegliere il modello evolutivo più opportuno sulla base di un test denominato “*likelihood ratio test*”.

Le distanze genetiche sono state espresse mediante medie (ed errore standard) in termini di n° sostituzioni/sito.

Gli alberi filogenetici sono stati ottenuti utilizzando l'algoritmo *Neighbor-Joining* che consente di generare alberi senza radice, basandosi sulle matrici di distanza con un'elevata efficienza e rapidità, dando una lunghezza dei rami proporzionale alla distanza genetica tra le unità tassonomiche.

La significatività degli alberi è stata stimata mediante il metodo *Bootstrap*, che consiste in un ricampionamento del multiallineamento estraendone a caso i siti. Sono stati considerati significativi i nodi interni supportati da un *bootstrap* maggiore del 75%.

La caratterizzazione molecolare del genotipo/sottotipo di HBV infettante è stata effettuata mediante l'analisi filogenetica, confrontando ciascuna sequenza del gene S e della regione pre-S in studio con opportune sequenze di riferimento.

La quantità dell'informazione filogenetica contenuta nel data set di sequenze in studio è stata ottenuta mediante il metodo di *Likelihood-mapping*⁶⁴ analizzando i 10,000 quartetti random. Il metodo si basa sui valori di *Maximum Likelihood* per le tre tipologie possibili degli alberi senza radice, costruiti su un gruppo di quattro sequenze (quartetti). Le tre verosimiglianze sono rappresentate come un punto all'interno di un triangolo equilatero. Il triangolo è diviso in 7 regioni (Figura 14).

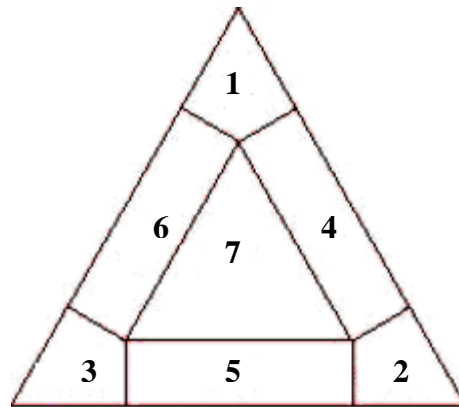


Figura 14. Diagramma di likelihood-mapping.

I tre angoli (regioni 1 + 2 + 3) rappresentano il *tree-like phylogenetic signal*, che vuol dire una risoluzione completa del segnale filogenetico, dovè un albero è molto meglio rispetto ad altri due; i tre regioni (4 + 5 + 6) rappresentano il *network-like phylogeny signal*, in cui è difficile distinguere tra due dei tre alberi; il regione centrale (n°. 7) rappresenta il *star-like phylogeny*, quale indica che le tre tipologie degli alberi sono scarsamente sostenuti.

Quando un'analisi di likelihood-mapping indica una percentuale uguale o maggiore di 20-30% dei punti nella *star-like phylogeny* oppure nella *network-like phylogeny*, questo suggerisce che i dati non sono adatti e affidabili per lo studio filogenetico.

ANALISI DEI RICOMBINANTI CON SIMPLOT

SIMPLOT *vs* 3.5.1 (Stuart C. Ray, 1998) è un programma che si avvale del metodo per la ricerca di ricombinazioni genomiche e permette di studiare sequenze con mosaicismi.

Il programma può utilizzare due distinti *output* grafici. Uno, detto *similarity plot* è rappresentato da una serie di linee che riflettono la similarità (o la distanza) di ogni sequenza (o gruppo di sequenze) di riferimento rispetto alla sequenza *query* da caratterizzare, considerando una finestra scorrevole lungo l'intera sequenza. Il secondo è generato mediante la cosiddetta analisi di *bootscanning*, che permette di calcolare la percentuale di alberi permutati generati considerando sempre una finestra scorrevole che si sposta progressivamente lungo l'intera sequenza. La dimensione della finestra e dello slittamento possono essere variati.

I punti di ricombinazione vengono individuati sia visivamente sia ripetendo l'analisi di *bootscanning* della sequenza *query* con le sequenze di riferimento.

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata condotta mediante pacchetti *software* quali EPI-INFO, versione 6 e SPSS versione 11.5.

Per la valutazione delle variabili qualitative sono stati impiegati i test di significatività (Chi quadrato) ed il test di Fisher. Le variabili quantitative (comprese le età e le distanze genetiche) sono state espresse mediante medie (\pm deviazione standard) e/o mediane (con campo di variazione-range).

La significatività statistica è stata valutata mediante test OpenEpi e test non parametrici quali il test di Mann-Whitney. Il livello di significatività per l'introduzione delle variabili nel modello finale è stato fissato a $p=0,01$ ($p < 0,05$).

ANALISI FILODINAMICA

L'alberi filogenetici e l'evolutionary rate sono stati calcolati mediante i metodi Bayesiani usando l'algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), incluso nel pacchetto *Beast vs 1.5.4*¹⁹⁰. La data dell'isolamento di campioni in studio varia dal 1980 a 2007.

L'analisi filogenetica è stata condotta anche sulla base di un modello temporale definito orologio molecolare (*Molecular Clock*)^{159, 160}. Tale modello si basa sull'assunto che le mutazioni si accumulino nel tempo in modo pressoché costante e permette di delineare le relazioni intercorrenti tra le distanze genetiche e il tempo, permettendo al tempo stesso di datare gli eventi di divergenza evolutiva¹⁹⁶.

Le sequenze virali vengono datate in base al momento del prelievo e i rami dell'albero filogenetico hanno una lunghezza proporzionale al tempo. Questo tipo di approccio stima la distanza temporale dei rami ed il tempo dell'ancestore comune più recente (TMRCA, *time of the most recent common ancestor*). I modelli più semplici prevedono un orologio molecolare più rigido (*strict clock model*), nel quale si assume che tutti i *lineage* evolvano alla stessa velocità; diversamente, nei modelli più complessi (*relaxed clock model*) le velocità evolutive variano nel tempo e tra i vari *lineage*, fornendo degli intervalli di variabilità intorno ad un valore medio della velocità evolutiva. Per l'analisi filodinamica condotta in questo studio, dopo aver testato tutti i modelli evolutivi, è stato selezionato un orologio molecolare di tipo *relaxed*, in cui ogni *lineage* ha un *rate* evolutivo caratteristico e non correlato con quello dei *lineage* contigui.

Questo tipo di analisi richiede inoltre dei sistemi di inferenza statistica che ne supportino la significatività.

Il programma MrBayes¹⁶² utilizzato per la costruzione dello *starting tree*, si fonda sulle teorie della statistica Bayesiana¹⁵⁸, che calcola la probabilità a posteriori dell'albero (ovvero la probabilità di ottenere un certo albero in base ai dati forniti), diversamente da

quanto avviene nel *Maximum Likelihood*, che ricerca la miglior *likelihood* dell'albero (ovvero la probabilità di ottenere i dati in base all'albero generato). La probabilità a posteriori è così calcolata, secondo le teorie Bayesiane, a partire dalla probabilità a posteriori dell'analisi filogenetica e dalla *likelihood* dell'albero.

Le probabilità a posteriori stimate vengono approssimate mediante l'algoritmo *Markov Chain Monte Carlo*¹⁵⁷ (MCMC). Inizialmente viene generato uno *starting tree* casuale che viene poi confrontato con un nuovo albero ottenuto modificando in modo sistematico il precedente e i relativi parametri; il secondo albero viene quindi accettato o rifiutato sulla base della probabilità a posteriori in uno specifico processo di campionamento. Questo sistema di confronto viene ripetuto a catena fino a ottenere l'albero con il più alto prodotto di probabilità a posteriore nodale tra tutti quelli generati (definito *consensus tree* o *Maximum clade credibility tree*). In questo modo si ottiene una stima della significatività dei *cluster* dell'albero, fornendo così dei valori supporto statistico.

Un altro concetto fondamentale per studiare l'evoluzione di una specie virale in una popolazione è quello della coalescenza²¹⁰. La teoria della coalescenza si basa sulla correlazione tra il tempo in cui due *taxa* o due *lineage* hanno condiviso uno stesso ancestore e le dimensioni della popolazione in esame. Applicando un orologio molecolare ad un albero filogenetico, è possibile stimare i nodi interni, che rappresentano gli eventi coalescenti, su una reale scala temporale; la teoria della coalescenza rappresenta così un ottimo strumento per valutare le modificazioni di una popolazione virale avvenute nel passato.

Per tracciare l'evoluzione dei *lineage* virali, da cui estrapolare gli eventi di coalescenza, è necessario disegnare uno *skyline plot*, che mostra le dimensioni della popolazione virale e il suo andamento su scala temporale.

Questo tipo di approccio è alla base dei metodi Bayesiani e del programma *Beast*¹⁹⁰.

Beast stima le dimensioni effettive, la velocità di mutazione e i *pattern* di crescita di una popolazione in base ad un modello evolutivo, basandosi su cinque componenti fondamentali:

- *Substitution model*: definisce le differenti velocità evolutive con cui avvengono le sostituzioni lungo i rami dell'albero

- *Rate model among sites*: definisce la distribuzione delle differenti velocità all'interno dei siti
- *Rate model among branches*: definisce la distribuzione delle differenti velocità tra i singoli rami, convertendo l'albero, che è in scala temporale, in unità di sostituzioni per sito per anno; questo modello è utilizzato per stimare il tempo di divergenza della popolazione
- *Tree*: definisce il modello delle relazioni filogenetiche tra le sequenze
- *Tree prior*: fornisce i parametri del modello evolutivo e la topologia dell'albero. Attualmente i modelli parametrici disponibili sono *constant size*, *exponential growth* e *logistical growth*.

Per l'analisi delle nostre sequenze è stato selezionato un modello GTR-I-G (*General-Time Reversible + Invariant sites + Gamma distribution rate*). Inoltre sono stati testati diversi modelli demografici parametrici (*constant population size*, *exponential*, *logistic growth*) e il modello non parametrico *Bayesian skyline plot* (BSP). Questi modelli evolutivi sono stati confrontati con un test di *Maximum Likelihood* in modo da valutare quale fosse il modello più rappresentativo per il *dataset* di sequenze di questo studio. Sulla base del *Bayes Factor* (BF) ottenuto è stato scelto il modello *relaxed skyline* (RelSky).

L'impiego del modello parametrico è stato utilizzato per stimare il *tasso di crescita* (r). Sulla sua base è stato stimato il *numero riproduttivo di base* (R_0), che rappresenta il numero medio di casi secondari infettati da un singolo caso primario in una popolazione senza difese immunitarie, usando la formula $R_0 = rD + 1$. D è la durata dell'infezione nei portatori²³⁰. Inoltre, è stato calcolato anche il *tempo di raddoppiamento dell'epidemia* $\lambda = \ln(2)/r$ ²³⁴.

L'analisi ottenuta tramite Beast deve poi essere validata dal software TRACER²⁸, il quale verifica la stima dell'effettiva dimensione del campione (ESS, *effective sample size*).

L'incertezza delle stime ottenute è stata indicata con intervalli di *Highest Posterior Density* del 95% (HPD).

L'albero datato mostrato è stato ottenuto selezionando l'albero con il più alto prodotto di probabilità a posteriori (*maximum clade credibility*), mediante il programma Tree Annotator.

RISULTATI

ANALISI FILOGENETICA DELLE SEQUENZE ALBANESI

Dei 73 campioni di siero provenienti dai pazienti HBsAg positivi analizzati tramite PCR, 63 hanno prodotto una quantità sufficiente di materiale nucleotidico per l'analisi di sequenze.

Le sequenze lunghe 1182 nucleotidi, comprendono la regione pre-S1, pre-S2 e S. Tra le altre si distinguono 5 sequenze, in quanto:

6OAT@05 ha una delezione di 20 nucleotidi nella posizione tra il 233-253 nucleotide

61RAT@05 ha una inserzione di 14 nucleotidi nella posizione 242-256

62GAV@07 e 63GAT@07 hanno, entrambi, una delezione dei primi 80 nucleotidi

49GAV@07 è un sospetto ricombinante non accertato dopo l'analisi fatta con il Simplot.

Tutte queste sequenze sono state escluse dalle successive analisi perchè potrebbero creare problemi durante l'analisi filogenetica e filodinamica.

Le 58 sequenze albanesi sono state allineate con 61 sequenze di riferimento rappresentative dei principali genotipi e sottogenotipi noti. L'analisi filogenetica costruita usando i metodi di neighbor-joining (NJ) e maximum-likelihood (ML) ha consentito di stabilire che tutti i soggetti albanesi hanno infezione con HBV di genotipo D, come mostrato in Figura 15 e 16.

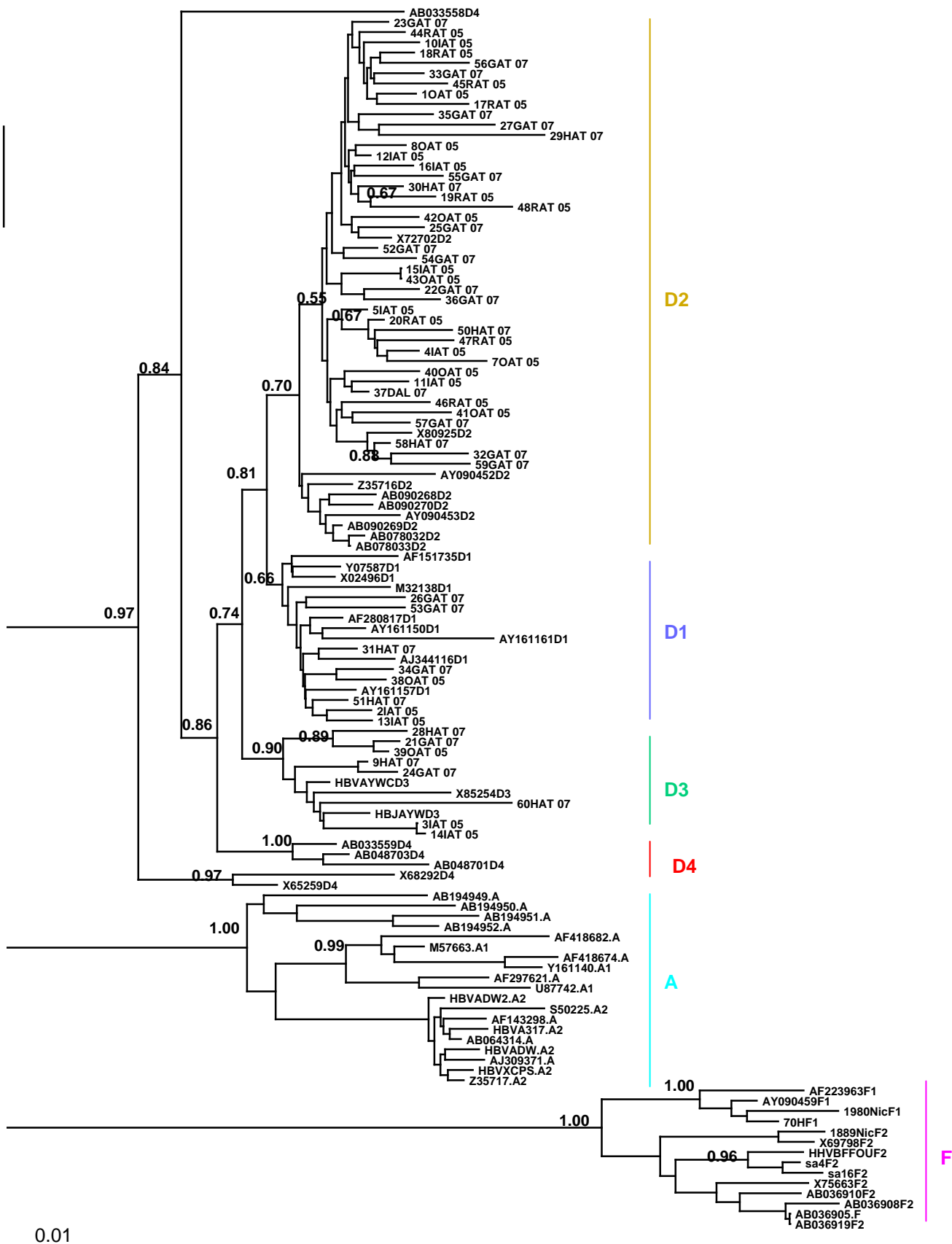


Figura 15. Albero filogenetico senza radice in NJ dei genotipi e sottogenotipi di HBV.

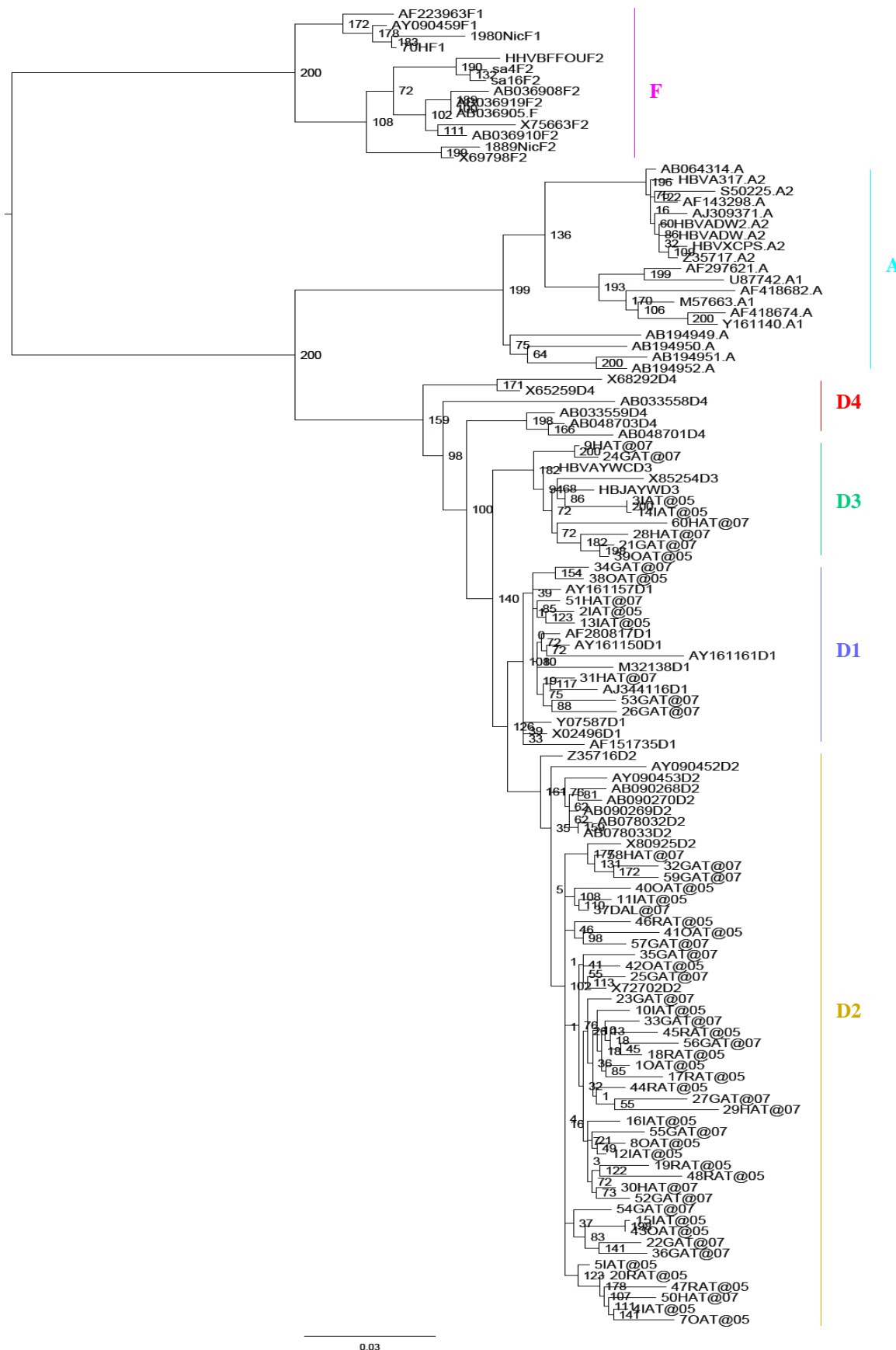


Figura 16. Albero filogenetico con radice in PhyML dei genotipi e sottogenotipi di HBV.

Il sottogenotipo più frequente è risultato il D2 che è presente nel 72% (42/58) dei pazienti seguito dai sottogenotipi D1 e D3 ciascuno presente nel 14% (8/58) dei pazienti (Figura 17).

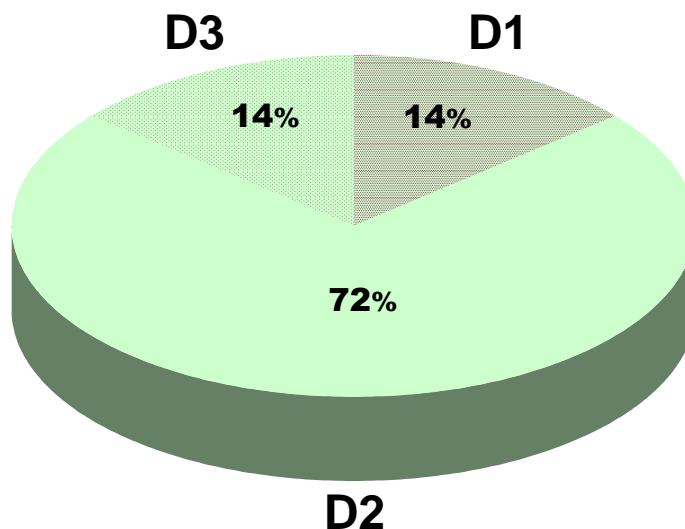
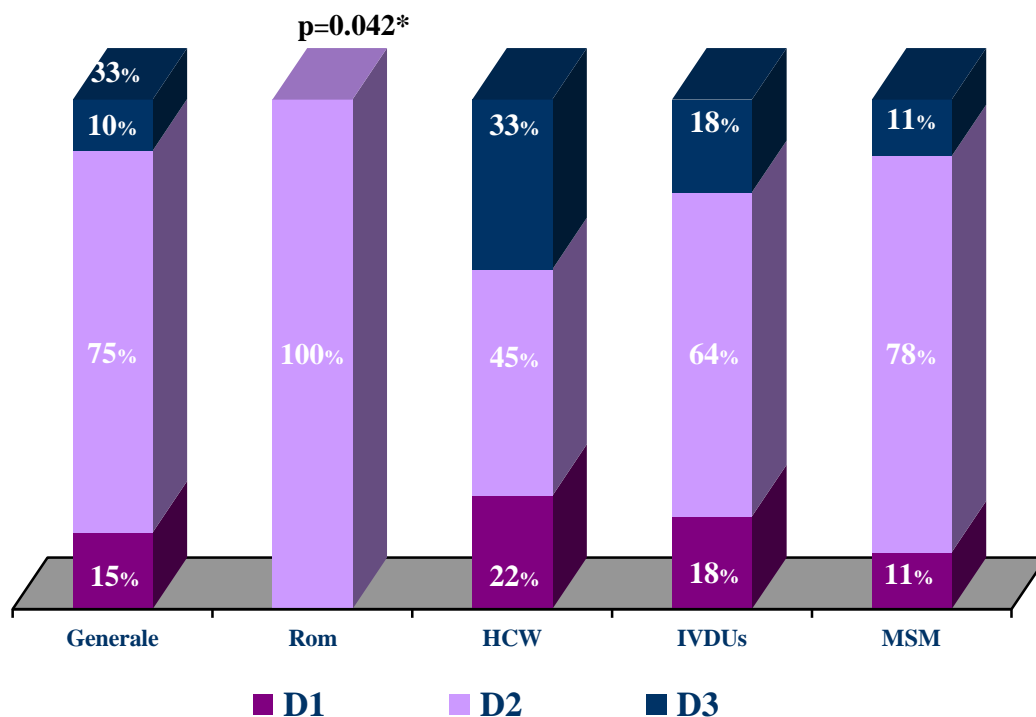


Figura 17. Distribuzione dei sottogenotipi di HBV.

Il sottogenotipo D1 è presente nel 15% (3/20) della popolazione generale, 22% (2/9) di soggetti esposti a rischio professionale (HCW), 18% (2/11) di tossicodipendenti (IVDUs) e 11% (1/9) degli omosessuali maschi (MSM).

Il sottogenotipo D2 è quello più diffuso in tutti i gruppi a rischio. E' presente nel 75% (15/20) della popolazione generale, 100% (9/9) della popolazione Rom (Rom versus non rom $p=0.042$, chi quadrato corretto secondo Miettinen – Mid-P exact Test), 45% (4/9) di HCW, 64% (7/11) degli IVDUs e 78% (7/9) degli omosessuali maschi. Tra quest'ultimi, 2 soggetti erano coinfecti con infezione da HIV-1.

Il sottogenotipo D3 è presente nel 10% (2/20) della popolazione generale, 33% (3/9) di HCW, 18% (2/11) degli IVDUs e 11% (1/9) di MSM (Figura 18).



* Il test statistico usato è OpenEpi.

Figura 18. Prevalenza dei sottogenotipi di HBV rispetto al fattore di rischio.

ANALISI FILOGENETICA DELLE SEQUENZE ITALIANE

Gli alberi filogenetici senza radice sono costruiti mediante metodo di *Neighbor Joining* (NJ). Il modello selezionato è *Kimura 2 Parametri* (K2P).

L'albero filogenetico dei genotipi (Figura 19) ottenuto dall'analisi delle 230 sequenze italiane in studio con 20 sequenze di riferimento dei principali genotipi di HBV, ha mostrato 8 *clade* (gruppi monofiletici) significativi (*bootstrap*=100), corrispondenti agli 8 genotipi virali (A-H).

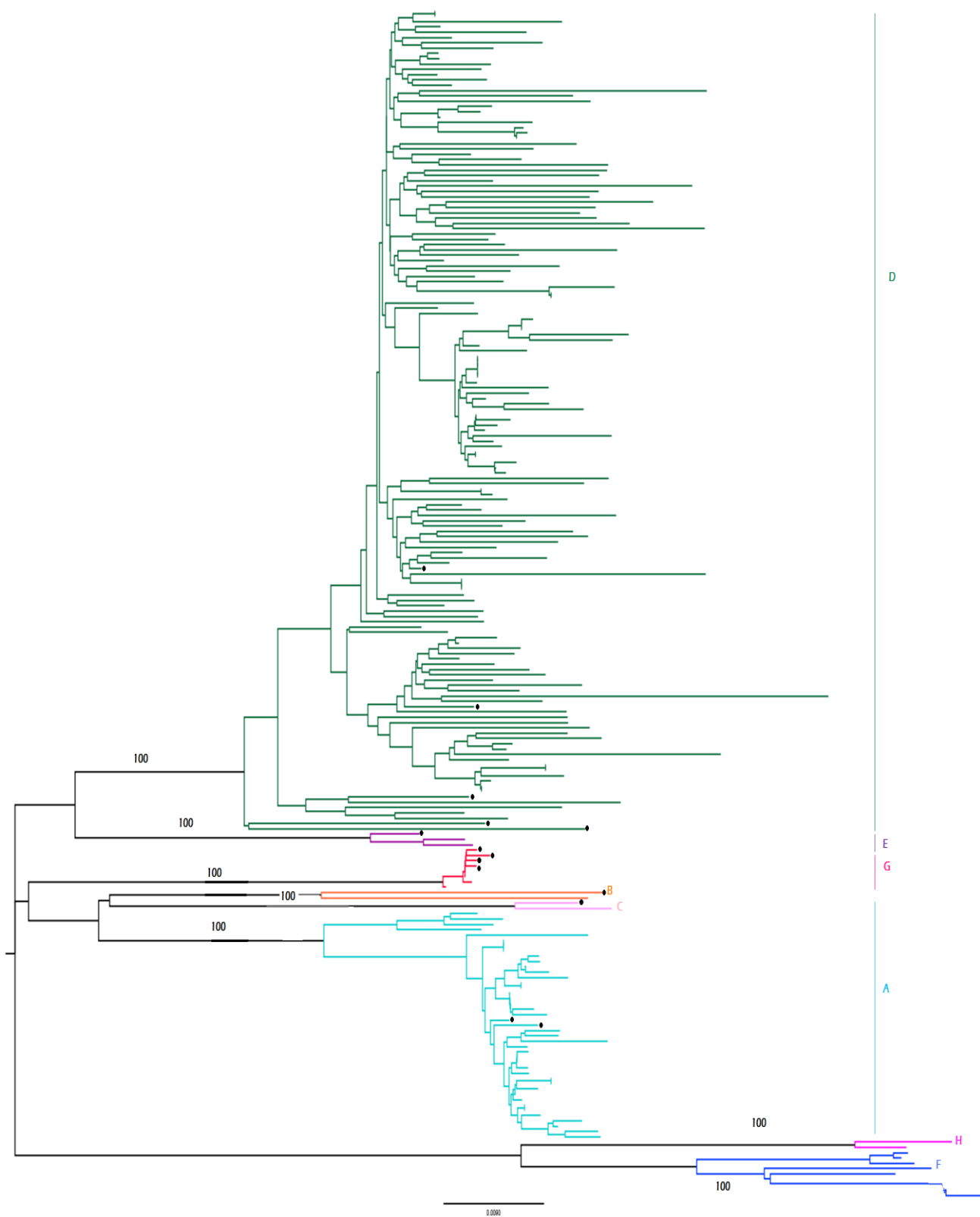


Figura 19. Albero filogenetico senza radice dei genotipi di HBV costruito sulle sequenze S di 1182 pb dei 230 pazienti e sulle 20 sequenze di riferimento genotipo-specifiche.

L'analisi filogenetica ha portato al riconoscimento di 166 (72.2%) ceppi di genotipo D, 45 (19.6%) di genotipo A, 8 (3.5%) di genotipo F, 7 (3%) di genotipo G, 1 (0.4%) di genotipo B, 1 (0.4%) di genotipo C e 2 (0.9%) di genotipo E.

L'analisi di ricombinazione condotta mediante programma *Simplot* ha consentito di evidenziare la presenza di 3 sequenze ricombinanti che mostravano uno “scambio” A/G in 1 caso, A/D nel secondo e D/A nel terzo (Figura 20-21-22).

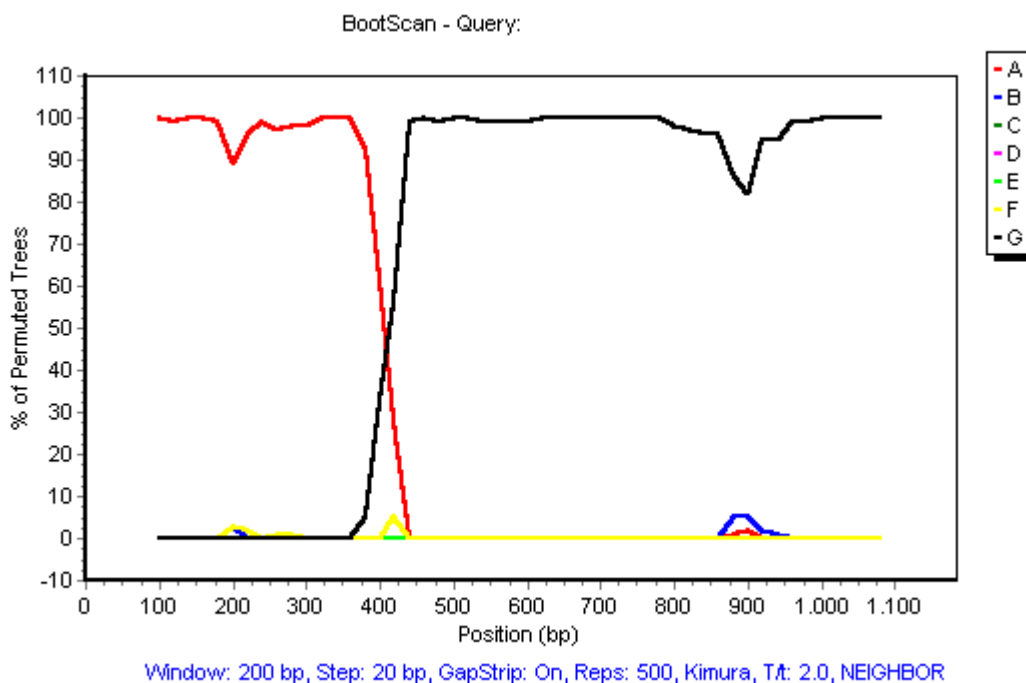


Figura 20. Analisi di bootscanning della sequenza S di 1182 pb che mostra un evento di ricombinazione A/G.

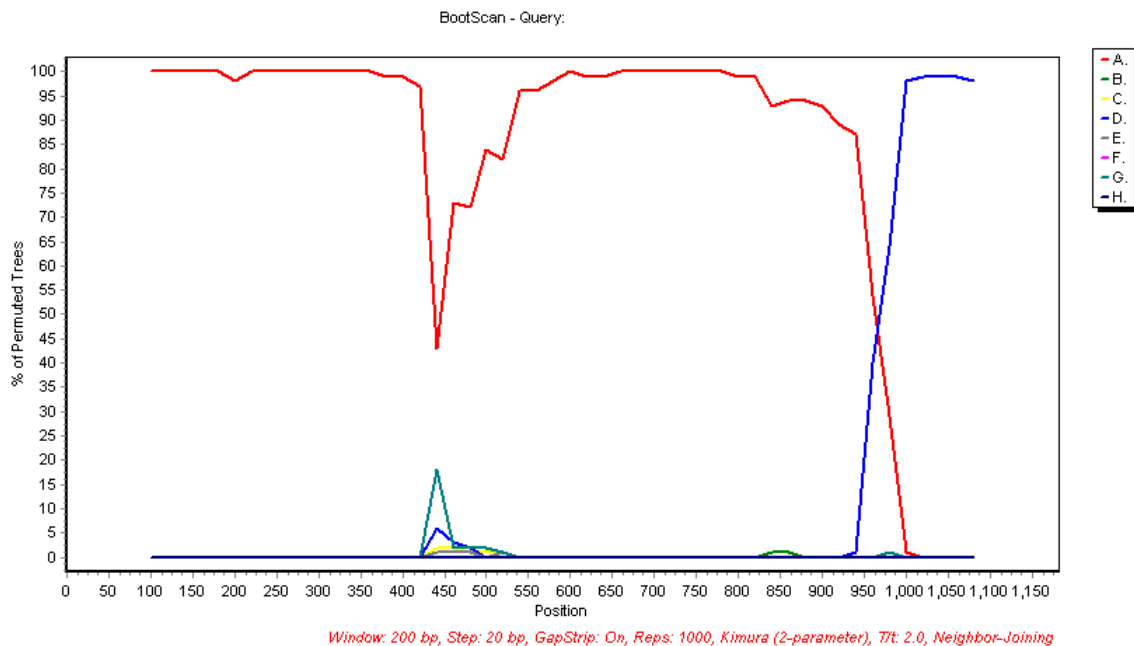


Figura 21. Analisi di bootscanning della sequenza S di 1182 pb che mostra un evento di ricombinazione A/D.

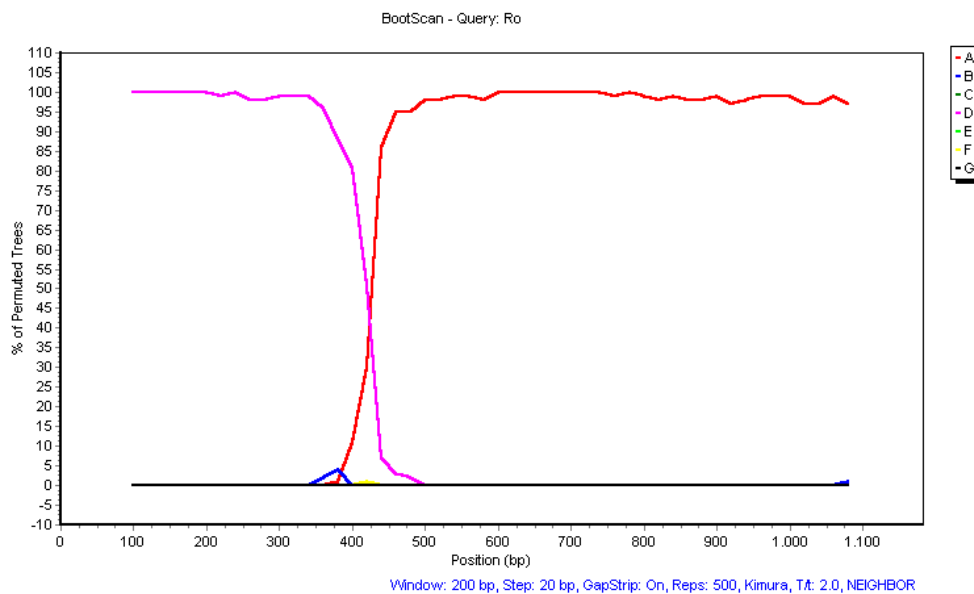


Figura 22. Analisi di bootscanning della sequenza S di 1182 pb che mostra un evento di ricombinazione D/A.

Dei 166 isolati di genotipo D, 16 (9.6%) soggetti sono risultati di sottogenotipo D1, 15 (9%) D2, 133 (80.1%) D3 e 2 soggetti (1.3%) di D4 (Figura 23).

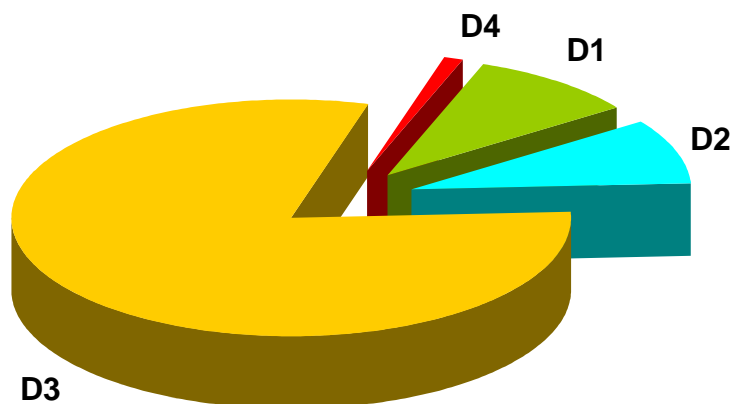


Figura 23. Distribuzione dei sottogenotipi D.

L'analisi filogenetica ha portato alla rilevazione di 3 (6.8%) dei 44 soggetti di genotipo A positivi al sottogenotipo A1 e di 41 soggetti (93.2%) con sottogenotipo A2 (Figura 24).

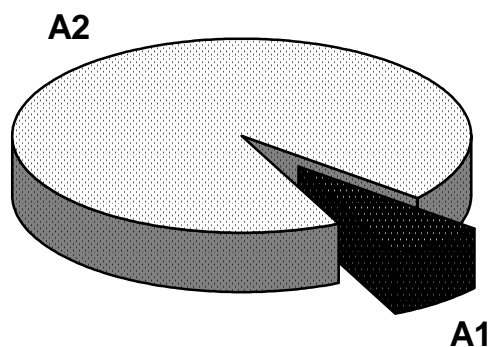


Figura 24. Distribuzione dei sottogenotipi A.

Per quanto riguarda gli 8 ceppi F, sono stati ottenuti 3 isolati (37.5%) di sottogenotipo F1 e 5 (62.5%) F2 (Figura 25).

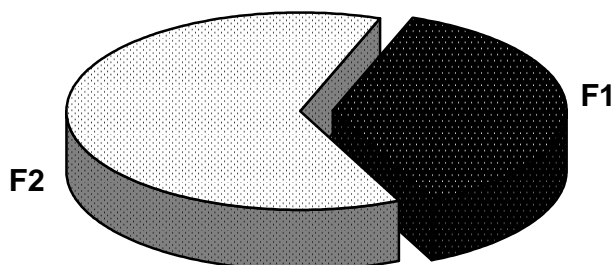


Figura 25. Distribuzione dei sottogenotipi F.

Il genotipo D è risultato essere il più diffuso tra i soggetti che facevano uso di droghe per via iniettiva rispetto a quelli che non mostravano tale fattore di rischio, (prevalenza nei tossicodipendenti del 69.2%, $p=0,04$). Il genotipo A risulta invece maggiormente associato ai soggetti omosessuali maschi rispetto a coloro che non riportavano l'omosessualità come fattore di rischio (66.7%, $p=0.016$).

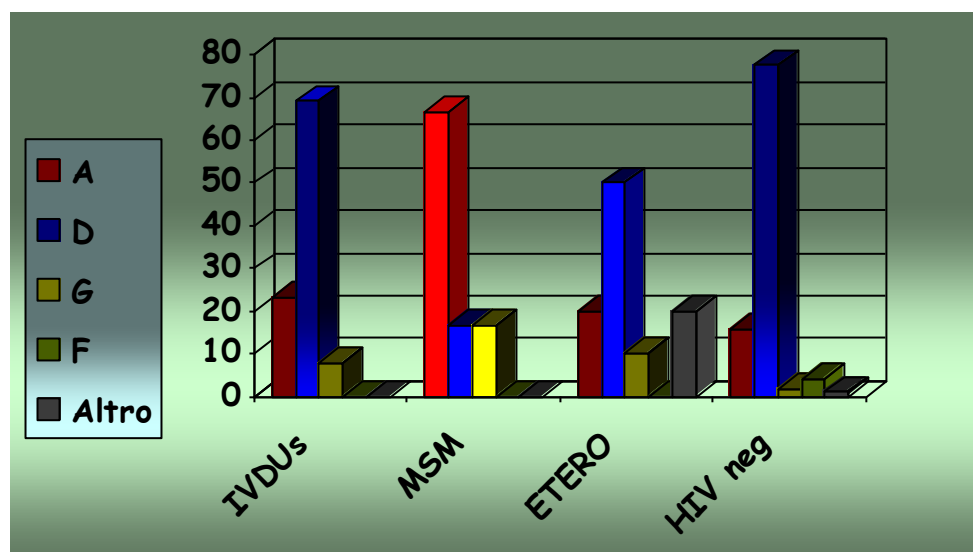


Figura 26. Prevalenza dei genotipi più rappresentati di HBV (A, D, G, F) rispetto al fattore di rischio nei soggetti HIV-1 positivi e HIV-1 negativi.

Dei 4 soggetti infetti con HBV di genotipo G, 2 (50%) riferivano comportamenti omosessuali, 1 (25%) comportamenti eterosessuali a rischio ed 1 (25%) era un soggetto tossicodipendente (Figura 26).

Tra i pazienti con infezione singola da HBV il fattore di esposizione era noto, come già detto, solo in una minoranza dei casi.

In particolare il sottogenotipo D3 risulta essere prevalente nei tossicodipendenti (69.2%), essendo virtualmente l'unico sottogenotipo D identificato nei genotipizzati. Il sottogenotipo A2 è il più frequente tra gli omosessuali (66.7%) (Figura 27).

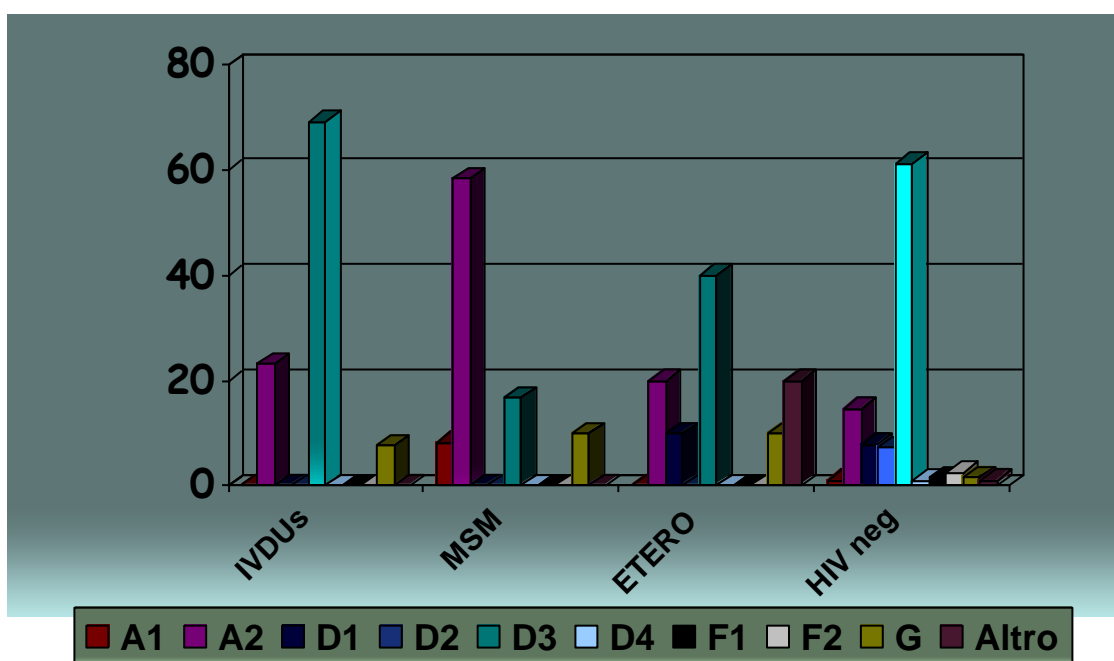


Figura 27. Prevalenza dei sottogenotipi di HBV rispetto al fattore di rischio nei soggetti HIV-1 positivi e HIV-1 negativi.

STIMA DELL'EVOLUTIONARY RATE

Per la stima dell'evolutionary rate (ER) del genotipo D in Albania abbiamo usato il data set che contiene 58 sequenze albanesi insieme a 65 sequenze italiane con un totale di 123

sequenze. Nelle sequenze italiane di genotipo D3 è compreso un clade molto frequente tra gli IVDUs che porta una serie di mutazioni di cui la più nota è la T125M, descritta da più autori negli IVDUs di tutto il mondo. Dal momento che l'origine e la storia di questo ceppo è tuttora oscura e dato che noi eravamo interessati allo studio dell'epidemia dei ceppi italiani ed albanesi abbiamo deciso di eliminare il ceppo D3, IVDUs dalla nostra analisi.

L'applicazione del metodo di likelihood mapping su questo allineamento di sequenza, valutando i 10,000 quartetti random, ha mostrato che il 95.9% dei quartetti scelti random si sono distribuiti negli angoli della mappa di verosimiglianza, mentre il 1.2% nella regione centrale. Questo indica che il segnale filogenetico è adatto per la ricostruzione filogenetica (Figura 28).

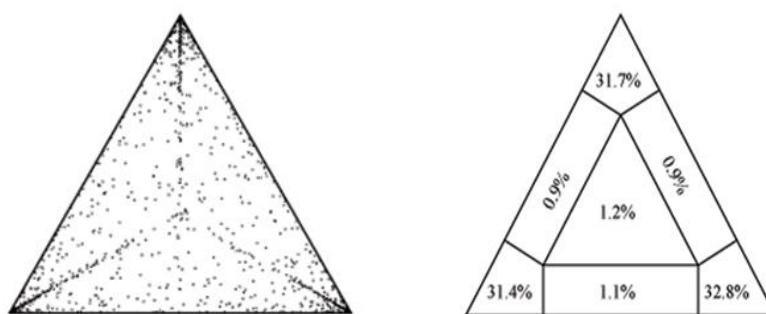


Figura 28. Likelihood mapping applicato sull'allineamento di 123 sequenze in studio.

Usando i metodi Bayesiani abbiamo comparato due modelli di orologi molecolari: lo “stretto” e il “rilassato”. Successivamente abbiamo confrontato i valori di marginal likelihoods degli alberi ottenuti tramite Bayes Factor (BF). L'analisi dimostra che l'albero prodotto con l'orologio molecolare rilassato è significativamente migliore di quello ottenuto con l'orologio molecolare stretto ($2\ln BF=97.2$).

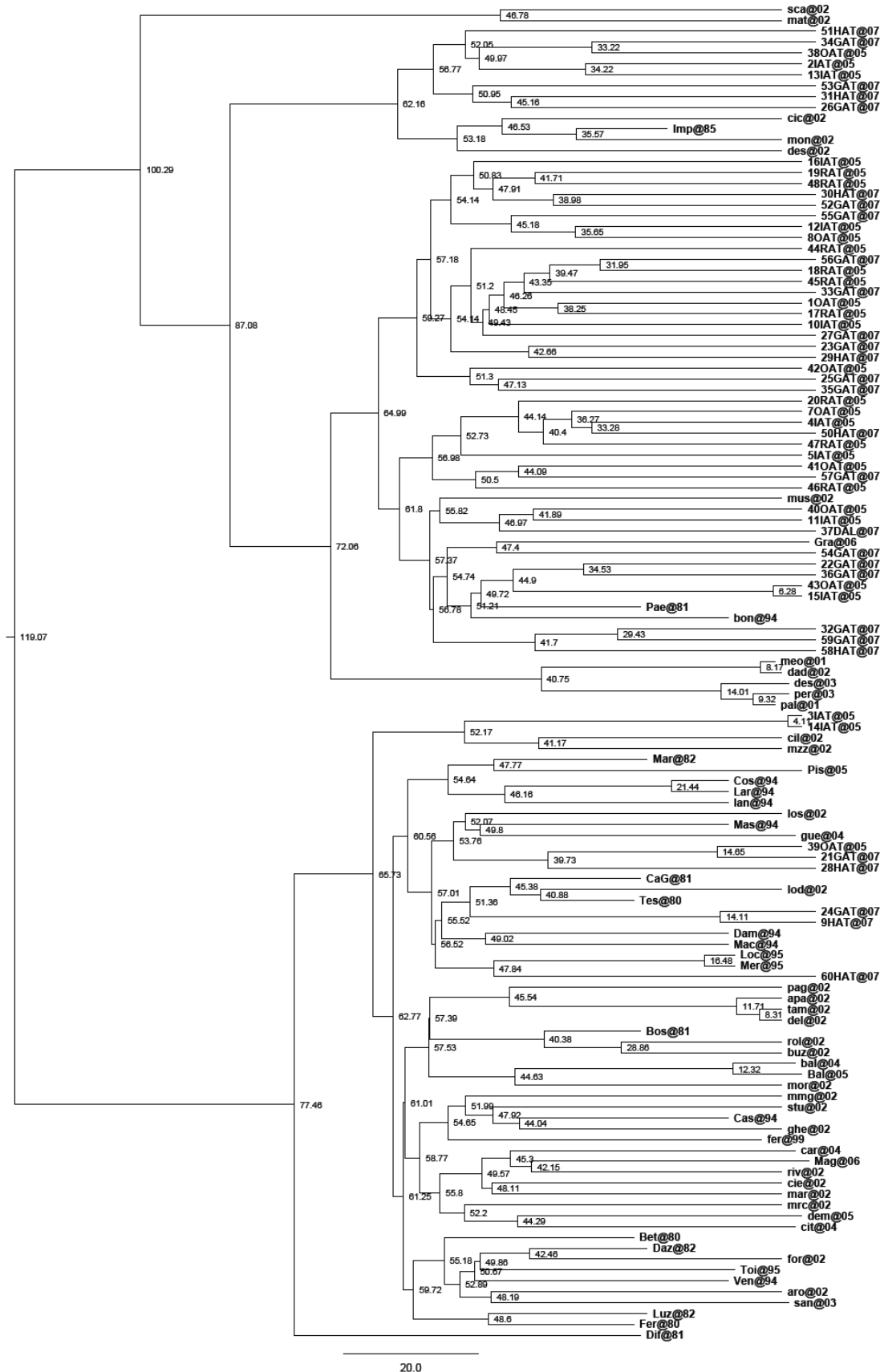


Figura 29. Albero datato costruito su 123 sequenze albanesi ed italiane, tutte di genotipo D, mediante l'orologio molecolare rilassato.

In queste condizioni, applicando lo stesso orologio molecolare rilassato abbiamo ottenuto una stima dell'ER pari a 4.07×10^{-4} sub/site/year (95%HPD $2.2 \times 10^{-4} - 6.0 \times 10^{-4}$) (Figura 29).

Abbiamo poi stimato lo stesso valore anche per i singoli sottogenotipi più frequenti, D3 italiano e D2 albanese (Tabella 4).

Evolutionary Rate	
Totale	4.1×10^{-4} ($2.2-6.0 \times 10^{-4}$)
D3	4.3×10^{-4} ($1.9-6.8 \times 10^{-4}$)
D2	4.83×10^{-4} ($0.6-8.4 \times 10^{-4}$)

Tabella 4. Stima dell'ER dell'albero completo e di sottogenotipi D2 e D3.

Dall'analisi dell'albero datato è emerso che:

- Si riconoscono numerosi clade significativi, in particolare quelli corrispondenti ai 4 sottogenotipi D presenti nell'analisi: D1 (pp=0.99), D2 (pp=1), D3 (pp=1), D4 (pp=1).
- In particolare analizzando i singoli clade è emerso che nel sottogenotipo D3 le 8 sequenze albanesi erano mescolate a quelle italiane, anche se tendono a formare gruppi di 2/3 sequenze significativi.
- Nel clade D1 la maggior parte dei ceppi albanesi sembrano segregare significativamente tra loro (pp=0.8-0.9) e così quelli italiani (pp=0.9).
- Infine più complessa è risultato la topologia del sottogenotipo D2. In questo caso, infatti, è stato identificato un grosso sottogruppo comprendente 22 di 45 (48.9%) isolati albanesi di questo sottogenotipo (pp=0.77). Oltre a questo abbiamo anche identificato un secondo gruppo comprendente 6 sequenze albanesi (pp=0.98), un clade con 4 sequenze (pp=0.91) e 2 clade da 3 isolati tutti albanesi (i clade comprendenti solo 2 sequenze non sono stati presi in considerazione). Inoltre è stato osservato anche un clade altamente significativo (pp=1) comprendente 5 delle 8 sequenze italiane e nessun isolato albanese.

L'analisi dei TMRCA ha mostrato che la radice dell'albero, ipotetica origine dei ceppi D1-D4 italiani ed albanesi, è datata tra 65 e 190 anni fa, con una stima media di 119 anni fa (anno 1888). Nella tabella 5 sono riportate le date di origine dei principali sottogenotipi e clades identificati.

Clade	Senza IVDUs
D1	1945 (1911-1968)
D2	1935 (1898-1965)
D2 albanese	1948 (1920-1971)
D3	1930 (1889-1960)
D4	1960 (1930-1990)

Tabella 5. Le date di origine dei principali sottogenotipi italiani ed albanesi.

Dall'analisi della tabella emerge che l'origine dei diversi sottogenotipi del ceppo D risale mediamente a circa 63 anni fa (1944): il sottogenotipo D3 sembra essere lievemente più antico (77 anni fa, 1930) e il D4 il più recente (47 anni fa, 1960) anche se i due soli isolati inclusi nello studio condividono un nodo (non significativo) molto più antico (100 anni fa), che suggerisce un ingresso recente in Italia di un sottogenotipo molto più antico.

Clade	Nr. degli isolati	TMRCA
A	22	37.88 (24-54), 1969 (1953-1983)
B	6	33.05 (21-42), 1974 (1965-1986)
C	4	28.1 (18-39), 1979 (1968-1989)
D	3	26.5 (15-40), 1981 (1967-1992)
E	2	28.6 (16-43), 1978 (1964-1991)
F italiani	5	22.4 (11-34), 1985 (1973-1996)

Tabella 6. TMRCA dei clades significativi italiani ed albanesi nel sottogenotipo D2.

L'analisi del TMRCA dei clades oltre i due isolati nel sottogenotipo D2 (Tabella 6) ha suggerito un'origine dei principali clades albanesi tra i 38 (24-54, il gruppo più ampio) e i 26 anni fa (1969-1981), mentre l'unico clade significativo italiano avrebbe iniziato a diffondersi circa 22 anni fa (1985), un periodo più recente rispetto al clade maggiore dei ceppi albanesi.

ANALISI FILODINAMICA

Al fine di delineare la storia epidemiologica/evolutiva del virus HBV in Italia ed in Albania abbiamo selezionato dal data set di partenza 50 sequenze di sottogenotipo D3 tutte italiane e 42 sequenze albanesi di sottogenotipo D2. Queste sequenze sono state impiegate per allestire i 2 data set (quello italiano e quello albanese) su cui è stata eseguita, indipendentemente, l'analisi di coalescenza. Dato che le sequenze albanesi non avevano una struttura temporale tale da permettere una stima indipendente dell'evolutionary rate, abbiamo deciso di condurre l'analisi impostando come parametro fisso l'evolutionary rate medio e l'intervallo di confidenza stimato sul data set completo comprendente tutti gli isolati di sottogenotipo D2 che è 4.83×10^{-4} sostituzioni/sito/anno (95%HPD $6 \times 10^{-5} - 8.4 \times 10^{-4}$).

L'analisi Bayesiana è stata eseguita assumendo lo stesso modello di sostituzione e orologio molecolare impiegato per il data set completo (GTR + I + orologio molecolare rilassato).

Sono stati confrontati tra loro 3 modelli parametrici di coalescenza corrispondenti a: popolazione costante, in crescita esponenziale e in crescita logistica, ed un modello non parametrico, rilassato, detto Bayesian Skyline Plot (BSP). Il confronto è stato ottenuto mediante Bayes Factor (BF), ed ha dimostrato che il modello BSP era quello che meglio si adattava alle sequenze analizzate.

Dall'esame dello skyline ottenuto sul data set di isolati albanesi (Figura 30) si osserva un andamento esponenziale dell'epidemia, che da un numero effettivo di infezioni di circa 10 negli anni '70, ha raggiunto un numero di circa 10 volte maggiore nel ventennio successivo, per poi essere caratterizzata da una crescita esplosiva di circa 40 volte tra la

fine degli anni '80 e il 1995. Dopo di ch , questa epidemia sembra aver raggiunto un plateau che perdura ancora oggi.

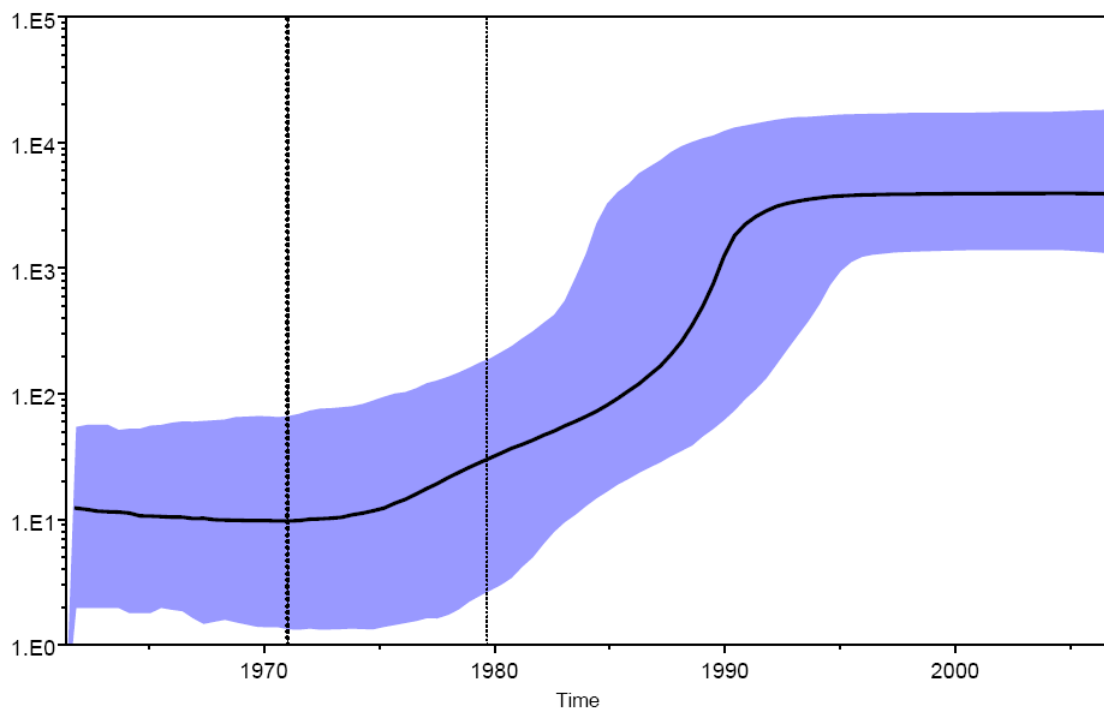


Figura 30. Skyline realizzato sul data set di isolati D2 albanesi.

L'impiego del modello parametrico ha permesso la stima del *tasso di crescita esponenziale* ($r=0.329$, un intervallo di credibilit  di 0.21-0.47). Sulla base di questa stima abbiamo potuto calcolare alcuni parametri epidemiologici fondamentali per la descrizione dell'epidemia verificatosi in Albania (Tabella 7). In particolare, abbiamo stimato un *numero riproduttivo di base* (R_0) variabile da 2.6 a 7.6 in relazione alla diversa possibile durata dell'infettivit  (rispettivamente 5, 10, 15 o 20 anni). Inoltre, sulla base del tasso di crescita stimato   possibile calcolare il *tempo di raddoppiamento dell'epidemia* $\lambda=\ln(2)/r$, in circa 2 anni ($\lambda=2.1$).

	Medio	Lower	Upper
r	0.329	0.21	0.47
R₀: D=5	2.6	2.05	3.35
D=10	4.3	3.1	5.7
D=15	5.9	4.15	8.05
D=20	7.6	5.2	10.4
λ	2.1	3.3	1.47

Tabella 7. Parametri epidemiologici dell'epidemia sostenuta di HBV sottogenotipo D2 in Albania.

L'analisi filodinamica delle sequenze D3 italiane è stata eseguita mediante gli stessi 3 modelli (popolazione costante, in crescita esponenziale e BSP) descritti.

Il confronto mediante BF ha dimostrato che i dati sostengono il modello non parametrico Bayesian Skyline Plot che è risultato significativamente migliore dagli altri e paragonabile al modello esponenziale.

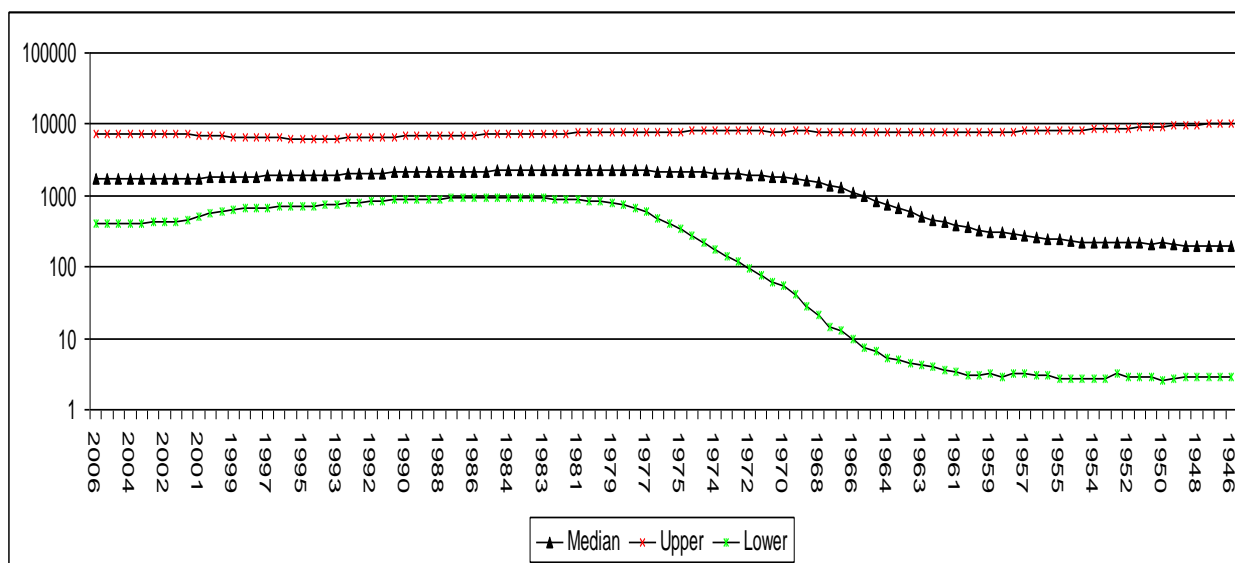


Figura 31. Skyline realizzato sul data set di isolati italiani HBV sottogenotipo D3.

L'analisi dello skyline (Figura 31) suggerisce che il sottogenotipo D3 sia presente in Italia da circa 60 anni (radice è 59.6 anni fa, intervallo di confidenza tra 37-92 anni fa) e sia rimasto ad un livello costante di endemia fino agli anni '60. Una crescita esponenziale di circa 6 volte del numero effettivo di infezioni si è verificata tra gli anni '60 e gli anni '70, mentre verso la fine degli anni '70 l'epidemia ha raggiunto un plateau. Inoltre, a partire dagli anni '90 si è osservata una lieve flessione nel numero di infezioni che sembra diminuire, ma l'osservazione non è significativa.

Anche in questo caso abbiamo stimato i principali valori epidemiologici riportati nella tabella 8.

	Medio	Lower	Upper
r	0.138	0.039	0.228
R₀:			
D=5	1.69	1.195	2.14
D=10	2.38	1.39	3.28
D=15	3.07	1.58	4.42
D=20	3.76	1.78	5.56
λ	5	17.8	3

Tabella 8. Parametri epidemiologici dell'epidemia sostenuta di HBV sottogenotipo D3 in Italia.

Il *tasso di crescita* è risultato uguale a 0.138 corrispondente a un *tempo di raddoppiamento* dell'epidemia di 5 anni.

DISCUSSIONE

I nostri dati dimostrano che nella totalità dei soggetti albanesi il virus dell'epatite B coinvolto è di genotipo D. In particolare, il sottogenotipo più diffuso risulta essere il D2, presente in più del 70% dei casi, mentre D1 e D3 sono equamente distribuiti nei restanti pazienti. Un caso particolare sembrano essere i pazienti di etnia Rom albanesi, i quali sono infetti nel 100% dei casi da HBV di sottogenotipo D2 ($p=0.042$).

Più complessa invece è risultata la distribuzione dei genotipi tra i pazienti italiani. In questo caso mentre circa il 70% di essi era infetto da HBV di genotipo D, il 20% circa aveva il genotipo A, il 3% il genotipo F e altrettanti il genotipo G. In una minoranza di pazienti, *per lo più di origine straniera*, sono stati riscontrati altri genotipi non endemici in Italia. La caratterizzazione del sottogenotipo ha mostrato che, tra gli isolati di genotipo D quello più frequente è risultato il D3 (>80%) seguito da D1 e D2 (10% circa dei pazienti ciascuno) e il D4 in una minoranza di soggetti. Anche nel caso del genotipo A è stata riscontrata la presenza di due dei sottogenotipi principali: A1 (in una minoranza dei casi) e A2 (in più del 90% dei casi). Infine gli 8 ceppi F sono risultati per il 37% dei casi F1 e per il 63% F2.

L'analisi della distribuzione dei sottogenotipi D tra i pazienti albanesi non ha mostrato alcuna differenza significativa, probabilmente a causa dell'estesa prevalenza del sottogenotipo D2. Tuttavia, i tossicodipendenti e soprattutto gli operatori sanitari, sembrano mostrare una tendenza verso una maggiore diffusione di altri sottogenotipi quali il D1 e il D3.

Tra i pazienti italiani abbiamo invece osservato una associazione significativa del genotipo D (in particolare il sottogenotipo D3) con la tossicodipendenza, mentre il genotipo A è risultato significativamente più frequente tra i pazienti omosessuali maschi ($p=0.016$).

Ulteriore scopo del presente studio è di delineare la storia epidemiologica recente dell'infezione da HBV in Albania ed in Italia, attraverso lo studio della filodinamica dei genotipi/sottogenotipi di HBV più diffusi. In particolare, abbiamo quindi focalizzato la

nostra attenzione sul sottogenotipo D2 in Albania e sul D3 in Italia. Ciò al fine di confrontare tempi e andamenti delle epidemie avvenute nei due Paesi, in scala temporale. Diversi metodi sono attualmente disponibili per studiare la filodinamica delle infezioni^{157-160, 190, 210}.

Per prima cosa è stato necessario stimare la velocità evolutiva (*evolutionary rate*) degli isolati di interesse. A questo scopo abbiamo costruito un allineamento comprendente tutti gli isolati datati di genotipo D a nostra disposizione, italiani ed albanesi, con la sola esclusione di un ceppo D3 altamente frequente tra i tossicodipendenti italiani (vedi di seguito), assumendo che tra un sottogenotipo e l'altro non vi siano velocità evolutive significativamente diverse.

In questo modo abbiamo ottenuto un valore di circa 4.1×10^{-4} sostituzioni/sito/anno (compreso in un intervallo di credibilità tra $2.2-6.0 \times 10^{-4}$), molto simile ai valori più recenti stimati (4.83×10^{-4} [$0.6-8.4 \times 10^{-4}$] per il sottogenotipo D2 albanese e 4.3×10^{-4} [$1.9-6.8 \times 10^{-4}$] per il sottogenotipo D3 italiano). In particolare, un nostro studio recente ha mostrato come si possono identificare differenze significative nell'*evolutionary rate* di diversi genotipi del virus dell'epatite B: il genotipo D evolve in generale ad una velocità evolutiva più elevata rispetto al genotipo A. Tali differenze possono dipendere da fattori legati alle dinamiche di popolazione dell'epidemia, quali la rapidità di diffusione, il numero di soggetti infetti, le modalità prevalenti di trasmissione (sessuale, quindi più lenta, per il genotipo A e parenterale o tossicodipendenza, quindi esplosiva, nel caso del genotipo D)⁸⁵. Nello stesso studio abbiamo segnalato che tra i tossicodipendenti italiani circola in gran prevalenza un ceppo di HBV del sottogenotipo D3 che segrega significativamente rispetto al D3 più diffuso nella popolazione generale, caratterizzato da una serie di mutazioni (di cui la T125M nella proteina S è quella più frequente), che è stato descritto anche in altre parti del mondo sempre associato alla tossicodipendenza. Questa osservazione suggerisce che tale ceppo abbia subito una storia epidemiologica molto diversa rispetto ai ceppi endemici in Italia. Al fine, quindi di evitare di sovrapporre più epidemie diverse, cosa che rischierebbe di confondere tanto la stima dell'*evolutionary rate* quanto la datazione dell'albero, abbiamo deciso di eliminare tale ceppo tanto dal presente studio.

La nostra stima attuale conferma l'alto livello di velocità evolutiva del genotipo D, molto più elevato di quello comunemente mostrato dai virus a DNA (normalmente nell'ambito di 10^{-7} - 10^{-6} sostituzioni/sito/anno)²³⁰ e più vicino a quello dei retrovirus (10^{-5} - 10^{-4} sostituzioni/sito/anno)²²⁹. D'altra parte è noto che HBV utilizza, durante il suo ciclo replicativo, una fase di trascrizione inversa, che consente la trasformazione dell'RNA pregenomico nel DNA circolare che viene poi incluso nelle particelle virali nascenti^{14, 63}. A questo scopo la polimerasi di HBV ha una nota funzione di trascrittasi virale e presenta forti analogie anche dal punto di vista strutturale con le polimerasi dei retrovirus³⁰.

Sulla base dell'evolutionary rate medio così stimato, sulla base di un orologio molecolare di tipo rilassato, che consente alla velocità evolutiva di variare lungo i diversi rami dell'albero, è stato costruito un albero datato in cui i tempi di coalescenza (TMRCA) corrispondenti ai nodi interni sono stati calcolati.

L'analisi dell'albero datato ha mostrato che frequentemente, in particolare a livello dei due sottogenotipi D2 e D3, le sequenze albanesi e quelle italiane segregano separatamente in modo significativo, suggerendo in tal modo l'esistenza di una struttura geografica dell'albero, dovuta probabilmente ad una indipendente evoluzione dei ceppi presenti nelle diverse aree esaminate. Al contrario, nel sottogenotipo D3, le sequenze albanesi sono più frequentemente mescolate a quelle italiane, ciò suggerendo un maggiore mescolamento di tale sottogenotipo, forse dovuto a ripetuti scambi nel tempo. Un'analisi più approfondita su base filogeografica occorre tuttavia per chiarire il significato di queste osservazioni.

Focalizzando l'attenzione sul sottogenotipo D2, abbiamo potuto riconoscere una serie di clade supportati da un'elevata probabilità posteriore, costituiti unicamente da isolati albanesi: in particolare, un cluster numeroso comprendente quasi la metà di tutti gli isolati albanesi D2 (22/45).

La stima dei TMRCA ha mostrato che l'origine del genotipo D caratterizzato nei pazienti italiani e albanesi, risale a una media di 119 anni fa, quindi nella seconda metà dell'800. Mentre l'origine dei diversi sottogenotipi analizzati (D1-D3) è compresa tra il 1930 (TMRCA di D3) e il 1945 (TMRCA di D1), quindi nel periodo tra le due guerre mondiali. Poco affidabile sembra invece la stima del TMRCA del

sottogenotipo D4 (1960), a causa del numero esiguo di isolati compresi nella nostra casistica. D'altra parte è noto che tale sottogenotipo è largamente diffuso in Australia, Giapponia, Papua Nuova Guinea ^{7, 14} mentre è solo sporadicamente presente in Europa, praticamente in Francia e Grecia ⁷. La presenza di un nodo (non significativo) molto più a monte di quello relativo ai due isolati italiani, suggerisce che probabilmente questo ceppo ha una storia molto più antica di quella degli isolati italiani.

In un recente studio condotto dal nostro gruppo utilizzando un approccio diverso basato sull'analisi di maximum likelihood e un orologio stretto, avevamo ipotizzato che la radice del genotipo D potesse cadere nei primi anni del '900 (intervallo di credibilità tra 72 e 108 anni fa), mentre l'origine del sottogenotipo D3 italiano fosse intorno agli anni '30 del '900 (intervallo di credibilità tra 60 e 86 anni fa) ⁸⁵. Le stime ottenute, nel corso dello studio oggetto della presente relazione, con i nuovi approcci Bayesiani e utilizzando un modello di orologio molecolare rilassato, non sono risultate significativamente diverse, essendo gli intervalli di credibilità stimati nei due studi, ampiamente sovrapponibili.

Focalizzando l'attenzione sui clade albanesi ed italiani identificati nel sottogenotipo D2, la stima dei TMRCA ha dato valori variabili tra i 38 anni fa, corrispondenti al TMRCA del clade più numeroso, ai 26 anni fa, suggerendo quindi un'origine dei principali clade albanesi in un periodo compreso tra la fine degli anni '60 e i primi anni '80.

L'unico clade significativo italiano nel sottogenotipo D2 ha un TMRCA stimato più recente rispetto a quelli albanesi, di circa 22 anni, corrispondente alla seconda metà degli anni '80, suggerendo quindi una diffusione di questo sottogenotipo in Italia più recente che in Albania.

L'analisi filodinamica è stata eseguita sui dataset separati D2 e D3 utilizzando isolati solo albanesi (nel primo caso) e solo italiani (nel secondo), proprio per confrontare la storia epidemiologica di HBV in anni recenti corrispondenti a quelli della diffusione dei sottogenotipi virali più prevalenti nelle due popolazioni.

Diversi metodi sono stati sviluppati per la stima della crescita della popolazione su base filogenetica, praticamente 3 modelli parametrici (*constant population size*, *exponential e logistic growth*) e un modello non parametrico *Bayesian skyline plot* (BSP).

L'analisi dello skyline del sottogenotipo D2 albanese ha mostrato che, dopo una lenta crescita iniziale (tra gli anni '70 e '80) dell'epidemia, si assiste ad una crescita

improvvisa e rapidissima del numero di infezioni tra la fine degli anni '80 e la prima metà del degli anni '90, quando è stato raggiunto il plateau. L'impiego di un modello parametrico di crescita esponenziale, ci ha permesso di stimare il tasso di crescita dell'epidemia ($r=0.3$) da cui abbiamo potuto derivare alcuni valori epidemiologici fondamentali, quali il tempo di raddoppiamento dell'epidemia, calcolato in 2.1 anni, durante il periodo di crescita esponenziale.

Le cause della crescita esponenziale di epidemia dal sottogenotipo D2 in Albania sono da attribuire ad una diffusione dell'infezione per via parenterale. Nel 1980, in Albania c'è stato una riduzione degli investimenti finanziari in sistema sanitaria²²⁸ che aveva portato come conseguenza, l'assenza di aghi e siringhe monouso, mancanza del sangue sicuro ed i suoi prodotti per transfusione, sterilizzazione inadeguata delle attrezzature riutilizzabili, difficoltà di procurare il materiale necessario per la prevenzione dell'esposizione al sangue. L'Introduzione della vaccinazione obbligatoria contro l'HBV per tutti i neonati nel 1995 e per i gruppi a rischio dopo il 2000, l'riorganizzazione del sistema sanitaria albanese con il miglioramento delle misure generali di prevenzione dell'infezione e con la prevenzione della trasmissione perinatale ed orizzontale di HBV hanno portato nella riduzione del livello dell'endemia da HBV nella seconda metà degli anni '90.

Dall'analisi dei dati italiani è emerso invece che il sottogenotipo D3 è entrato in Italia in un periodo compreso tra le 2 guerre mondiali, ma ha subito una crescita esponenziale tra gli anni '50 e gli anni '70 raggiungendo quindi un plateau che perdura ancora oggi, nonostante un'apparente tendenza (non significativa) alla diminuzione negli ultimi 20 anni. Questi dati suggeriscono che la diffusione in Italia del sottogenotipo predominante tra le infezioni cosiddette "community acquired", corrisponde ad un periodo in cui si è fatto largo uso delle pratiche trasfusionali di sangue e i suoi derivati, in assenza di metodi efficaci per lo screening dei donatori. Questo giustificherebbe anche il plateau raggiunto negli anni '70, quando sono stati introdotti i test per HBsAg nella selezione di donatori. Ulteriori studi occorrere per confermare la riduzione del numero di infetti negli ultimi decenni probabilmente in relazione a diversi fattori tra cui l'introduzione nel 1997 della vaccinazione di massa anti-epatite B.

In conclusione, quindi i nostri dati delineano due diverse epidemie dell'infezione da HBV in Italia ed in Albania. In particolare, mentre in Italia la larga diffusione del sottogenotipo

D3 si sarebbe verificata tra gli anni '50 e '70 sostenuta dal largo impiego di trasfusioni di sangue non sicure, in Albania l'ingresso e la diffusione del sottogenotipo D2 si sarebbe verificato più tardivamente, tra gli anni '80 e '90 probabilmente in seguito della trasmissione parenterale del virus.

I valori epidemiologici fondamentali come R_0 e il tempo di raddoppiamento dell'epidemia suggeriscono una diffusione molto rapida dell'infezione in tempi relativamente brevi in Albania, mentre più lenta ed estesa in un intervallo di tempo più lungo in Italia.

BIBLIOGRAFIA

1. **Rizzetto M**, Volpes R, Smedile A. Response of pre-core mutant chronic hepatitis B infection to lamivudine. *J Med Virol* 2000; 61(3): 398-402.
2. **Leblebicioglu H**, Eroglu C, members of the Hepatitis Study Group. Acute hepatitis B virus infection in Turkey: epidemiology and genotype distribution. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 537-541.
3. **Sunbul M**, Leblebicioglu H. Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1976-1980.
4. **Pourkarim M.R**, Amini-Bavil-Olyae S, Verbeeck J, Lemey P, Zeller M, Rahman M, Maes P, Nevens F, Van Ranst M. Molecular evolutionary analysis and mutational pattern of full-length genomes of hepatitis B virus isolated from Belgian patients with different clinical manifestations. *J Med Virol* 2010; 82(3): 379-389.
5. **Mohebbi S.R**, Amini-Bavil-Olyae S, Zali N, Noorinayer B, Derakhshan F, Chiani M, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Iran. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 858-866.
6. **Banerjee A**, Kurbanov F, Datta S, Chandra P.K, Tanaka Y, Mizokami M, Chakravarty R. Phylogenetic relatedness and genetic diversity of hepatitis B virus isolates in Eastern India. *J Med Virol* 2006; 78: 1164-1174.
7. **Norder H**, Couroucé A.M, Coursaget P, Echevarria J.M, Leef S.D, Mushahwar I.K, Robertson B.H, Locarnini S, Magnus L.O. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47: 289-309.
8. **Amini-Bavil-Olyae S**, Alavian S.M, Adeli A, Sarrami-Forooshani R, Sabahi F, Sabouri E, Tavangar H.R, Azizi M, Mahboudi F. Hepatitis B virus genotyping, core promoter, and precore/core mutations among Afghan patients infected with hepatitis B: a preliminary report. *J Med Virol* 2006; 78: 358-364.
9. **Abbas Z**, Muzaffar R, Siddiqui A, Naqvi S.A, Rizvi S.A. Genetic variability in the precore and core promoter regions of hepatitis B virus strains in Karachi. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 20.

10. **Abdo A.A**, Al-Jarallah B.M, Sanai F.M, Hersi A.S, Al-Swat K, et al. Hepatitis B genotypes: relation to clinical outcome in patients with chronic hepatitis B in Saudi Arabia. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7019-7024.
11. **Lazarevic I**, Cupic M, Delic D, Svirtlih N.S, Simonovic J, Jovanovic T. Distribution of HBV genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes among chronically infected patients in Serbia. *Arch Virol* 2007; 152(11): 2017-2025.
12. **Bozdayi G**, Türkyilmaz A.R, Idilman R, Karatayli E, Rota S, Yurdaydin C, Bozdayi A.M. Complete genome sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolated from Turkish patients with chronic HBV infection. *J Med Virol* 2005; 76: 476-481.
13. **Zhou Y**, Holmes E.C. Bayesian estimates of the evolutionary rate and age of hepatitis B virus. *J Mol Evol* 2007; 65: 197-205.
14. **Kay A**, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res* 2007; 127: 164-176.
15. **Schaefer S**. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepatitis* 2005; 12: 111-124.
16. **Schaefer S**. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007; 13(1): 14-21.
17. **Echevarría J.M**, Avellón A. Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol* 2006; 78: S36-S42.
18. **Lesnikar V**. Epidemiology of hepatitis B and C in Croatia. *Acta Med Croatica* 2005; 59: 377-381.
19. **Quaglio G**, Ramadani N, Pattaro C, Cami A, Dentico P, Volpe A, Pellizzer G, Berisha A, Smacchia C, Figliomeni M, Schinaia N, Rezza G, Putoto G. Prevalence and risk factors for viral hepatitis in the Kosovar population: implications for health policy. *J Med Virol* 2008; 80: 833-840.
20. **Hannoun C**, Horal P, Lindh M. Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome. *J Gen Virol* 2000; 81: 75-83.
21. **Meldal B.H**, Moula N.M, Barnes I.H, Boukef K, Allain J.P. A novel hepatitis B virus subgenotype D7 in Tunisian blood donors. *J Gen Virol* 2009; 90: 1622-1628.

22. **Ezzikouri S**, Chemin I, Chafik A, Wakrim L, Nourlil J, et al. Genotype determination in Moroccan hepatitis B chronic carriers. *Infect Genet Evol* 2008; 8: 306-312.
23. **Ismail A.M**, Ziada H.N, Sheashaa H.A, Shehab El-Din A.B. Decline of viral hepatitis prevalence among asymptomatic Egyptian blood donors: a glimmer of hope. *Eur J Intern Med* 2009; 20: 490-493.
24. **Mulyanto**, Depamede S.N, Surayah K, Tjahyono A.A, Jirintai, Nagashima S, Takahashi M, Okamoto H. Identification and characterization of novel hepatitis B virus subgenotype C10 in Nusa Tenggara, Indonesia. *Arch Virol* 2010; 155: 705-715.
25. **Abdou Chekaraou M**, Brichler S, Mansour W, et al. A new hepatitis B virus subgenotype D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulating in Niger along with HBV/E strains. *J Gen Virol* 2010; 91: 1609-1620.
26. **Hubschen J.M**, Mbah P.O, Forbi J.C, Otegbayo J.A, Olinger C.M, Charpentier E, Muller C.P. Detection of a new subgenotype of hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria. *Clin Microbiol Infect* 2010; doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03205.x.
27. **Yu H**, Yuan Q, Ge S.X, et al. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PloS One* 2010; 5: e9297.
28. TRACER Home Page <http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>
29. **Resuli B**. The incidence of HBV in cancer-cirrhosis. *Buletini UT, Tiranë* 1986; 4: 114-119.
30. **The hepatitis B virus Page**: providing current information on the hepatitis B virus. Replication. *Robert's HBV Page*.
31. **Schädler S**, Hildt E. HBV life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses* 2009; 1: 185-209.
32. **Khan N**, Guarnieri M, Ahn S.H, Li J, Zhou Y, Bang G, Kim K.H, Wands J.R, Tong S. Modulation of hepatitis B virus secretion by naturally occurring mutations in the S gene. *J Virol* 2004; 78(7): 3262-3270.

33. **Cavinta L**, Sun J, Zarnekow M, Barzaga N, Schaefer S. New hepatitis B virus subgenotype C5 from the Philippines. sub-mitted.
34. **Kew M.C.** Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathol Biologie* 2010; 58: 273-277.
35. **Yang J**, Xing K, Deng R, Wang J, Wang X. Identification of Hepatitis B virus putative intergenotype recombinants by using fragment typing. *J Gen Virol* 2006; 87: 2203-2215.
36. **Simmonds P**, Midgley S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes. *J Virol* 2005; 79: 15467-15476.
37. **Dény P**, Zoulim F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathol Biol* 2010; doi:10.1016/j.patbio.2010.05.002.
38. **Alter M.J.** Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol* 2003; 39: S64-69.
39. **Kondili L.A**, Brunetto M.R, Maina A.M, Argentini C, Chionne P, La Sorsa V, Resuli B, Mele A, Rapicetta M. Clinical and molecular characterization of chronic hepatitis B in Albania: a country that is still highly endemic for HBV infection. *J Med Virol* 2005; 75: 20-26.
40. **Katsanos K.H**, Christodoulou D.K, Zervou E, Babameto A, Kraja B, Hyphantis H, Karetsos V, Tsonis G, Basho J, Resuli B, Tsianos E.V. Hepatitis B remains a major health priority in Western Balkans: results of a 4-year prospective Greek-Albanian collaborative study. *Eur J Int Med* 2009; 20: 698-702.
41. **Katsoulidou A**, Paraskevis D, Magiorkinis E, Moschidis Z, Haida C, Hatzitheodorou E, Varaklioti A, Karafoulidou A, Hatzitaki M, Kavallierou L, Mouzaki A, Andrioti E, Veneti C, Kaperoni A, Zervou E, Politis C, Hatzakis A. Molecular characterization of occult hepatitis B cases in Greek blood donors. *J Med Virol* 2009; 81(5): 815-825.
42. **De Maddalena C**, Giambelli C, Tanzi E, Colzani D, Schiavini M, Milazzo L, Bernini F, Ebranati E, Cargnel A, Bruno R, Galli M, Zehender G. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology* 2007; 365: 113-124.

43. **Kondili L.A**, Cuko L, Chionne P, Candido A, Madonna E, Dentico P, Resuli B, Taliani G, Brunetto M.R, Rapicetta M. Hepatitis B, C and Delta virus infections in Albanian patients with chronic liver disease: evaluation of possible changes during the last 10 years. *Eur J Gastroenterol & Hepatol* 2010; 22: 167-171.
44. **Botha J.F**, Ritchie M.J.J, Dusheiko G.M, Mouton H.W.K, Kew M.C. Hepatitis B virus carrier state in Black Children in Ovamboland: role of perinatal and horizontal transmission. *Lancet* 1984; 2: 1210-1212.
45. **Tamura K**, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24(8): 1596-1599.
46. **McMahon B.J**. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2009; 3(2): 334-342.
47. **Resuli B**, Prifti S, Kraja B, Nurka T, Basho M, Sadiku E. Epidemiology of hepatitis B virus infection in Albania. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 849-852.
48. **Miyakawa Y**, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 2003; 46(6): 329-338.
49. **European Association for the Study of the Liver**. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50: 227-242.
50. **Kondili L.A**, Ulqinaku D, Hajdini M, Basho M, Chionne P, Madonna E, Taliani G, Candido A, Dentico P, Bino S, Rapicetta M. Hepatitis B virus infection in health care workers in Albania: a country still highly endemic for HBV infection. *Infection* 2007; 35: 94-97.
51. **Chironna M**, Germinario C, Lopalco P.L, Quarto M, Barbuti S. HBV, HCV and HDV infections in Albanian refugees in Southern Italy (Apulia region). *Epidemiol Infect* 2000; 125: 163-167.
52. **Santantonio T**, Lo Caputo S, Germinario C, Squarcione S, Greco D, Laddago V, Pastore G. Prevalence of hepatitis virus infections in Albanian refugees. *Eur J Epidemiol* 1993; 9(5): 537-540.
53. **Chironna M**, Germinario C, Lopalco P.L, Carrozzini F, Quarto M. Prevalence of hepatitis virus infections in Kosovar refugees. *Int J Infect Dis* 2001; 5(4): 209-213.

54. **World Health Organization.** Childhood diseases in Africa, *Fact Sheet N109*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1996, <http://www.who.int/inf-fs/en/fact109html>
55. **Ljunggren K.K**, Miyakawa Y, Kidd A. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002; 83: 1267-1280.
56. **Dane D.S**, Cameron C.H, Briggs M. Virus-like particle in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis B. *Lancet* 1970; 2: 695.
57. **Locarnini S**, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Seminars in liver disease* 2001; 23. **Lee W.M.** Medical progress: Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337 (24): 1733-1745.
58. **Pichoud C**, Seigneres B, Wang Z, et al. Transient selection of hepatitis B virus polymerase gene mutant associated with a decreased replication capacity and famciclovir resistance. *Hepatology* 1999; 29: 230-237.
59. **Klinkert M**, Theilmann L, Praff E, Schaller H. Pre-S1 antigens and antibodies early in the course of acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 1996; 58; 522-525.
60. **Milich D.R**, Sallberg M, Maruyama T. The humoral immune response in acute and chronic hepatitis B virus infection. *Springer Semin Immunopathol* 1995; 17: 14-66.
61. **Magnius L.O**, Espmark J.A. New specificities in Australian antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. *J Immunol* 1972; 109: 1017-1021.
62. **Okamoto H**, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J Virol* 1987; 61: 3030-3034.
63. **Will H**, Reiser W, Weimer T, et al. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* 1987; 61: 904-911.
64. **Strimmer K**, Von Haeseler A. Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(13): 6815-6819.
65. **Tutleman J.S**, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently close circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 1986; 47: 451-460.

66. **Ganem D**, Prince A. Hepatitis B virus infection - natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129.
67. **Gerlich W.H**, Heermann K.H, Lu X. Functions of hepatitis B surface proteins. *Arch Virol Suppl* 1992; 4: 129-132.
68. **Bruss V**, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1059-1063.
69. **Ganem D**, Schneider R.J. Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, 4th ed, Knipe D.M, Howley P.M, Eds; Lippincott Williams: Wilkins, Philadelphia, USA 2001; 2: 2923-2969.
70. **Bruns M**, Miska S, Chassot S, Will H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* 1998; 72: 1462-1468.
71. **Robinson W.S**, Lutwick L.I. The virus of hepatitis, type B. *N Engl J Med* 1976; 295: 1168-1175.
72. **Huovila A.P**, Eder A.M, Fuller S.D. Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* 1992; 118: 1305-1320.
73. **Patient R**, Hourieux C, Sizaret P.Y, Trassard S, Sureau C, Roingard P. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol* 2007; 81: 3842-3851.
74. **Mangold C.M**, Streeck R.E. Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J Virol* 1993; 67: 4588-4597.
75. **Wallace W**, Carman W. Surface variation of HBV: scientific and medical relevance. *Viral Hepat* 1997; 3: 5-16.
76. **Piazza M**. Epatite virale acuta e cronica. *VIII Edizione*, 2005.
77. **Norder H**, Couroucé A.M, Magnius L.O. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 1992; 73: 3141-3145.
78. **Norder H**, Ebert J.W, Fields H.A, Mushahwar I.K, Magnius L.O. Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virol* 1996; 218: 214-223.
79. **Couroucé-Pauty A.M**, Lemaire J.M, Roux J.F. New hepatitis B surface antigen inside the ad category. *Vox Sang* 1978; 27: 533-549.

80. **Magnius L.O**, Kaplan L, Vyas G.N, Perkins H.A. A new virus specified determinant of hepatitis B surface antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* 1975; 83: 295-297.
81. **Bartholomeusz A**, Locarnini S. Mutations in the hepatitis B virus polymerase gene that are associated with resistance to famciclovir and lamivudine. *Int Antiviral News* 1997; 5: 123-124.
82. **Summers J**, Mason W.S. Replication of the genome of a hepatitis-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1990; 29: 403-415.
83. **Yen T.S.B**. Hepadnaviral X protein: review of recent progress. *J Biomed Sci* 1996; 3: 20-30.
84. **Bruss V**, Gerlich W.H. Formation of transmembranous Hepatitis B e antigen by cotraslation in vitro processing of the viral precore protein. *Virology* 1988; 163: 268-275.
85. **Zehender G**, De Maddalena C, Giambelli C, Milazzo L, Schiavini M, Bruno R, Tanzi E, Galli M. Different evolutionary rates and epidemic growth of hepatitis B virus genotypes A and D. *Virology* 2008; 380: 84-90.
86. **Colin W.S**, Edgar P.S, Lyn F, Anthony E.F, Beth P.B. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiologic Reviews* 2006; 28: 112-125.
87. **Okamoto H**, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69(Pt 10): 2575-2583.
88. **Kramvis A**, Arakawa K, Yu M.C, Nogueira R, Stram D.O, Kew M.C. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 2008; 80: 27-46.
89. **Arankalle V.A**, Gandhe S.S, Borkakoty B.J, Walimbe A.M, Biswas D, Mahanta J. A novel HBV recombinant (genotype I) similar to Vietnam/Laos in a primitive tribe in Eastern India. *J Viral Hepat* 2010; 17: 501-510.
90. **Olinger C.M**, Jutavijittum P, Hubschen J.M, et al. Possible new hepatitis B virus genotype, South-East Asia. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1777-1780.
91. **Hannoun C**, Norder H, Lindh M. An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. *J Gen Virol* 2000; 81: 2267-2272.

92. **Tran T.T**, Trinh T.N, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol* 2008; 82: 5657-5663.
93. **Kurbanov F**, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepato Res* 2010; 40: 14-30.
94. **Kurbanov F**, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. When should “I” consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol* 2008; 82: 8241-8242.
95. **Tatematsu K**, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol* 2009; 83: 10538-10547.
96. **Lusida M.I**, Nugrahaputra V.E, Soetjipto, Handajani R, et al. Novel subgenotypes of hepatitis B virus genotypes C and D in Papua, Indonesia. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2160-2166.
97. **Mulyanto**, Depamede S.N, Surayah K, Tsuda F, Ichiyama K, Takahashi M, Okamoto H. A nationwide molecular epidemiological study on hepatitis B virus in Indonesia: identification of two novel subgenotypes, B8 and C7. *Arch Virol* 2009; 154: 1047-1059.
98. **Nurainy N**, Muljono D.H, Sudoyo H, Marzuki S. Genetic study of hepatitis B virus in Indonesia reveals a new subgenotype of genotype B in east Nusa Tenggara. *Arch Virol* 2008; 153: 1057-1065.
99. **Kimbi G.C**, Kramvis A, Kew M.C. Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. *J Gen Virol* 2004; 85: 1211-1220.
100. **Kramvis A**, Weitzmann L, Owiredu W.K, Kew M.C. Analysis of the complete genome of subgroup A’ hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol* 2002; 83: 835-839.
101. **Owiredu W.K**, Kramvis A, Kew M.C. Molecular analysis of hepatitis B virus genomes isolated from black African patients with fulminant hepatitis B. *J Med Virol* 2001; 65: 485-492.
102. **Kurbanov F**, Tanaka Y, Fujiwara K, Sugauchi F, Mbanya D, Zekeng L, Ndembu N, Ngansop C, Kaptue L, Miura T, Ido E, Hayami M, Ichimura H, Mizokami M. A

- new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol* 2005; 86: 2047-2056.
103. **Makuwa M**, Souquiere S, Telfer P, Apetrei C, Vray M, Bedjabaga I, Mouinga-Ondeme A, Onanga R, Marx P.A, Kazanji M, Roques P, Simon F. Identification of hepatitis B virus subgenotype A3 in rural Gabon. *J Med Virol* 2006; 78: 1175-1184.
104. **Hubschen J.M**, Mugabo J, Peltier C.A, et al. Exceptional genetic variability of hepatitis B virus indicates that Rwanda is east of an emerging African genotype E/A1 divide. *J Med Virol* 2009; 81: 435-440.
105. **Hannoun C**, Soderstrom A, Norkrans G, Lindh M. Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. *J Gen Virol* 2005; 86: 2163-2167.
106. **Olinger C.M**, Venard V, Njayou M, Oyefolu A.O, Maiga I, Kemp A.J, Omilabu S.A, le Faou A, Muller C.P. Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *J Gen Virol* 2006; 87: 1163-1173.
107. **Andernach I.E**, Nolte C, Pape J.W, Muller C.P. Slave trade and hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in Haiti and Africa. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1222-1228.
108. **Sugauchi F**, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol* 2002; 76: 5985-5992.
109. **Sugauchi F**, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Gish RG, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology* 2003; 124: 925-932.
110. **Sugauchi F**, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Kato H, Suzuki S, Kimura Y, Ueda R, Butterworth L.A, Cooksley W.G. A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines: complete genome sequence and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2001; 82: 883-892.

111. **Nagasaki F**, Niitsuma H, Cervantes J.G, Chiba M, Hong S, Ojima T, Ueno Y, Bondoc E, Kobayashi K, Ishii M, Shimosegawa T. Analysis of the entire nucleotide sequence of hepatitis B virus genotype B in the Philippines reveals a new subgenotype of genotype B. *J Gen Virol* 2006; 87: 1175-1180.
112. **Sakamoto T**, Tanaka Y, Orito E, Co J, Clavio J, Sugauchi F, Ito K, Ozasa A, Quino A, Ueda R, Sollano J, Mizokami M. Novel subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotypes B and C among chronic liver disease patients in the Philippines. *J Gen Virol* 2006; 87: 1873-1882.
113. **Chan H.L**, Tsui S.K, Tse C.H, Ng E.Y, Au T.C, Yuen L, Bartholomeusz A, Leung K.S, Lee K.H, Locarnini S, Sung J.J. Epidemiological and virological characteristics of 2 subgroups of hepatitis B virus genotype C. *J Infect Dis* 2005; 191: 2022-2032.
114. **Huy T.T**, Ushijima H, Quang V.X, Win K.M, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 2004; 85: 283-292.
115. **Tanaka Y**, Orito E, Yuen M.F, Mukaide M, Sugauchi F, Ito K, Ozasa A, Sakamoto T, Kurbanov F, Lai C.L, Mizokami M. Two subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotype C: A novel subtyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *Hepatol Res* 2005; 33: 216-224.
116. **Osiowy C**, Larke B, Giles E. Distinct geographical and demographic distribution of hepatitis B virus genotypes in the Canadian Arctic as revealed through an extensive molecular epidemiological survey. *J Viral Hepat* 2010. [Epub ahead of print]
117. **Cavinta L**, Cao G, Schaefer S. Description of a new hepatitis B virus C6 subgenotype found in the Papua province of Indonesia and suggested renaming of a tentative C6 subgenotype found in the Philippines as subgenotype C7. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3068-3069.
118. **Fujiwara K**, Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Kato T, Sugihara K, Hasegawa I, Sakurai M, Ito K, Ozasa A, Sakamoto Y, Arita I, El-Gohary A, Benoit A, Ogoundele-Akplogan S.I, Yoshihara N, Ueda R, Mizokami M. Distribution of HBV genotypes among HBV carriers in Benin: phylogenetic analysis and virological characteristics of HBV genotype E. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6410-6415.

119. **Huy TT**, Ishikawa K, Ampofo W, Izumi T, Nakajima A, Ansah J, Tetteh J.O, Nii-Trebi N, Aidoo S, Ofori-Adjei D, Sata T, Ushijima H, Abe K. Characteristics of hepatitis B virus in Ghana: full length genome sequences indicate the endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol* 2006; 78: 178-184.
120. **Kato H**, Fujiwara K, Gish R.G, Sakugawa H, Yoshizawa H, Sugauchi F, Orito E, Ueda R, Tanaka Y, Kato T, Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying genotype F of hepatitis B virus into F1 and F2 subtypes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6295-6304.
121. **Norder H**, Arauz-Ruiz P, Blitz L, Pujol F.H, Echevarria J.M, Magnius L.O. The T(1858) variant predisposing to the precore stop mutation correlates with one of two major genotype F hepatitis B virus clades. *J Gen Virol* 2003; 84: 2083-2087.
122. **Naumann H**, Schaefer S, Yoshida C.F, Gaspar A.M, Repp R, Gerlich W.H. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 8): 1627-1632.
123. **Devesa M**, Rodriguez C, Leon G, Liprandi F, Pujol F.H. Clade analysis and surface antigen polymorphism of hepatitis B virus American genotypes. *J Med Virol* 2004; 72: 377-384.
124. **Huy TT**, Ushijima H, Sata T, Abe K. Genomic characterization of HBV genotype F in Bolivia: genotype F subgenotypes correlate with geographic distribution and T (1858) variant. *Arch Virol* 2006; 151: 589-597.
125. **Arauz-Ruiz P**, Norder H, Robertson B.H, Magnius L.O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073.
126. **Stuyver L**, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi R.F, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74.
127. **Mulders M.N**, Venard V, Njayou M, et al. Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J Infect Dis* 2004; 190 (2): 400-408.

128. **Sanchez L.V**, Maldonado M, Bastidas-Ramirez B.E, Norder H, Panduro A. Genotypes and S-gene variability of Mexican hepatitis B virus strains. *J Med Virol* 2002; 68(1): 24-32.
129. **Arauz-Ruiz P**, Norder H, Robertson B, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073.
130. **Lindh M**. HBV genotype G - an odd genotype of unknown origin. *J Clin Virol* 2005; 34: 315-316.
131. **Bekondi C**, Olinger C.M, Boua N, Talarmin A, Muller C.P, Le Faou A, Venard V. Central African Republic is part of the West-African hepatitis B virus genotype E crescent. *J Clin Virol* 2007; 40: 31-37.
132. **Garmiri P**, Loua A, Haba N, Candotti D, Allain J.P. Deletions and recombinations in the core region of hepatitis B virus genotype E strains from asymptomatic blood donors in Guinea, west Africa. *J Gen Virol* 2009; 90: 2442-2451.
133. **Laoi B.N**, Crowley B. Molecular characterization of hepatitis B virus (HBV) isolates, including identification of a novel recombinant, in patients with acute HBV infection attending an Irish hospital. *J Med Virol* 2008; 80: 1554-1564.
134. **Morozov V**, Pisareva M, Groudinin M. Homologous recombination between different genotypes of hepatitis B virus. *Gene* 2000; 260: 55-65.
135. **Luo K**, Liu Z, He H, Peng J, Liang W, Dai W, Hou J. The putative recombination of hepatitis B virus genotype B with pre-C/C region of genotype C. *Virus Genes* 2004; 29: 31-41.
136. **Owiredu W.K**, Kramvis A, Kew M.C. Hepatitis B virus DNA in serum of healthy black African adults positive for hepatitis B surface antibody alone: possible association with recombination between genotypes A and D. *J Med Virol* 2001; 64: 441-454.
137. **Cui C**, Shi J, Hui L, Xi H, Zhuoma, Quni, Tsedan, Hu G. The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid. *J Gen Virol* 2002; 83: 2773-2777.

138. **Wang Z**, Liu Z, Zeng G, Wen S, Qi Y, Ma S, Naoumov N.V, Hou J. A new intertype recombinant between genotypes C and D of hepatitis B virus identified in China. *J Gen Virol* 2005; 86: 985-990.
139. **Suwannakarn K**, Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Abe K, Poovorawan Y. A novel recombinant of hepatitis B virus genotypes G and C isolated from a Thai patient with hepatocellular carcinoma. *J Gen Virol* 2005; 86: 3027-3030.
140. **Mamadou S**, Laouel Kader A, Rabiou S, Aboubacar A, Soumana O, Garba A, Delaporte E, Mboup S. Prevalence of the HIV infection and five other sexually-transmitted infections among sex workers in Niamey, Niger. *Bull Soc Pathol Exot* 2006; 99: 19-22.
141. **Soubiran G**, Le Bras M, Marini P, Sekou H. High HBsAg and anti-delta carrier rate among asymptomatic Africans living on the campus of the University of Niamey, Niger. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 998-1000.
142. **Cenac A**, Pedroso M.L, Djibo A, Develoux M, Pichoud C, Lamothe F, Trepo C, Warter A. Hepatitis B, C, and D virus infections in patients with chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma: a comparative study in Niger. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 293-296.
143. **Khelifa F**, Thibault V. Characteristics of hepatitis B viral strains in chronic carrier patients from north-east Algeria. *Pathol Biol (Paris)* 2009; 57: 107-113.
144. **Hubschen J.M**, Andernach I.E, Muller C.P. Hepatitis B virus genotype E variability in Africa. *J Clin Virol* 2008; 43: 376-380.
145. **Kramvis A**, Kew M.C. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatology Res* 2007; 37: S9-S19.
146. **Zeng G**, Wang Z, Wen S, Jiang J, Wang L, Cheng J, Tan D, Xiao F, Ma S, Li W, Luo K, Naoumov N.V, Hou J. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China. *J Viral Hepat* 2005; 12: 609-617.
147. **Nowak M.A**, Bonhoeffer S, Hill A.M, Boehme R, Thomas H.C, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4398-4402.

148. **Brechtbuehl K**, Whalley S.A, Dusheiko G.M, Saunders N.A. A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *J Virol Methods* 2001; 93: 105-113.
149. **Ferrari C**, Missale G, Boni C, et al. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepat* 2003; 39: S36-S42.
150. **Chisari F.V.** Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60.
151. **Guidotti L.G**, Chisari F.V. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* 1996; 8(4): 478-483.
152. **Chisari F.V.** Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* 1997; 99: 1472-1477.
153. **Mahoney F.J.** Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Clin Microbiol Reviews* 1999; 12(2): 351-366.
154. **Milich D.R**, Jones J.E, Hughes J.L, et al. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6599-6604.
155. **Lee W.M.** Medical progress: hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337 (24): 1733-1745.
156. **Villeneuve J.P.** The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Virol* 2005; 34(Suppl1): S139-142.
157. **Hastings W.K.** Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their application. *Biometrika* 1970; 57: 97-109.
158. **Huelsenbeck J.P**, Ronquist F, et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 2001; 294: 2310-2314.
159. **Bromham L**, Penny D. The modern molecular clock. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 216-224.
160. **Pybus O.G**, Rambaut A. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nature* 2009; 10: 540-550.
161. **Fattovich G**, Olivari N, Pasino M, D'Onofrio M, Martone E, Donato F. Long-term outcome of chronic hepatitis B in Caucasian patients: mortality after 25 years. *Gut* 2008; 57: 84-90.

162. MrBayes Home Page <http://mrbayes.csit.fsu.edu/>
163. **Felsenstein J.** Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 1989; 5: 164-166.
164. **Edmunds W.J,** Medley G.F, Nokes D.J, O'Callaghan C.J, Whittle H.C, Hall A.J. Epidemiological patterns of hepatitis B virus (HBV) in highly endemic areas. *Epidemiol Infect* 1996; 117: 313-325.
165. **Schutte K,** Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma-epidemiological trends and risk factors. *Dig Dis* 2009; 27: 80-92.
166. **Lok A.S,** McMahon B.J. Chronic hepatitis B. *Hepatol* 2007; 45: 507-539.
167. **Chang M.H,** You S.L, Chen C.J, Liu C.J, Lee C.M, Lin S.M, et al. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccines: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 1348-1355.
168. **Ishimaro Y,** Ishimaro H, Toda G, et al. An epidemic of infantile popular acrodermatitis (Gianotti' disease) in Japan associated with hepatitis B surface antigen subtype ayw. *Lancet* 1976: 707-709.
169. **Alter J.M.** Epidemiology and prevention of hepatitis B. *Seminars in liver disease* 2003; 23; 1.
170. **Kao J.H,** Chen P.J, Lai M.Y, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118(3): 554-559.
171. **Tsubota A,** Arase Y, Fengrong R, et al. Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype adw. *J Med Virol* 2001; 65: 257-265.
172. **Chen D.S.** From hepatitis to hepatoma: lessons from type B viral hepatitis. *Science* 1993; 262: 369-370.
173. **Chu C.J,** Hussain M, Lok A.S. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 2002; 122(7): 1756-1762.
174. **Sanchez-Tapias J.M,** Costa J, Mas A, et al. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002; 123(6):1848-1856.

175. **Thakur V**, Guptan R.C, Kazim S.N, et al. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 165-170.
176. **Yuasa R**, Takahashi K, Dien B.V, et al. Properties of hepatitis B virus genome recovered from Vietnamese patients with fulminant hepatitis in comparison with those of acute hepatitis. *J Med Virol* 2000; 61: 23-28.
177. **Casey J.L**, Niro G.A, Engle R.E, et al. Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon Basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. *J Infect Dis* 1996; 174: 920-926.
178. **Flodgren E**, Bengtsson S, Knutsson M, et al. Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing hepatitis B and D virus strains. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3311-3316.
179. **Kao J.H**, Wu N.H, Chen P.J, et al. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000; 33(6): 998-1002.
180. **Posada D**, Crandall K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998; 14: 817-818.
181. **Nardone A**, Anastassopoulou C.G, Theeten H, Kriz B, Davidkin I, Thierfelder W, O'Flanagan D, Bruzzone B, et al. A comparison of hepatitis B seroepidemiology in ten European countries. *Epidemiol Infect* 2009; 137; 961-969.
182. **Zollner B**, Peterson J, Schroter M, et al. 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. *Lancet* 2001; 357(9260): 934-935.
183. **Buti M**, Cotrina M, Valdes A, et al. Is hepatitis B subtype testing useful in predicting virological response and resistance to lamivudine? *J Hepatol* 2002; 36(3): 445-446.
184. **Fung S.K**, Lok A.S. Hepatitis B virus genotypes: do they play a role in the outcome of HBV infection? *Hepatol* 2004; 40(4): 790-792.
185. **Solomon R**, Van Raden M, Kaslow R, et al. Association of hepatitis B surface antigen and core antibody with acquisition and manifestations of the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Public Health* 1990; 80: 1475-1478.

186. **Laure F**, Zagury D, Saimont A, et al. Hepatitis B virus DNA sequences in lymphoid cells from patients with AIDS and AIDS-related complex. *Science* 1985; 229: 561-563.
187. **Gomez-Gonzalo M**, Carretero M, Ruas J, et al. The hepatitis B virus X protein induces HIV-1 replication and transcription in synergy with T-cell activation signals: functional roles of NF-kappaB/NF-AT and SP1-binding sites in the HIV-1 long terminal repeat promoter. *J Biol Chem* 2001; 276(38): 35435-35443.
188. **Eskil A**, Magnus P, Peterson G, et al. Hepatitis B antibodies in HIV-infected homosexual men are associated with more rapid progression to AIDS. *AIDS* 1992; 6: 571-574.
189. **Thompson J.D**, et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-4680.
190. **Drummond A.J**, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 2007; 7: 214-222.
191. **Sinicco A**, Raiteri R, Sciandra M, et al. Co-infected and superinfection of hepatitis B virus in patients infected with immunodeficiency virus: no evidence of faster progression to AIDS. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 111-115.
192. **Rockstroh J.K**. Management of hepatitis B and C in HIV co-infected patients. *J AIDS* 2003; 34: S59-65.
193. **Nunez M**, Puoti M, Camino N, et al. Treatment of chronic hepatitis B in the human immunodeficiency virus-infected patient: present and future. *CID* 2003; 37: 1678-1685.
194. **Thio C.L**, Seaberg E.C, Skolasky R, Phair J, et al. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the Multicenter Cohort Study (MACS). *Lancet* 2002; 360: 1921-1926.
195. **Carr A**, Cooper D.A. Restoration of immunity to chronic hepatitis B infection in HIV-infected patients on protease inhibitor. *Lancet* 1997; 349: 995-996.
196. **Rutschmann F**. Molecular dating of phylogenetic trees: a brief review of current methods that calculate divergence times. *Divers Distrib* 2006; 12: 35-48.

197. **Sakamoto T**, Tanaka Y, Simonetti J, Osiowy C, Børresen M.L, et al. Classification of hepatitis B virus genotype B into 2 major types based on characterization of a novel subgenotype in Arctic indigenous populations. *J Infect Dis* 2007; 196: 1487-1492.
198. **Dalekos G.N**, Zervou E, Karabini F, Tsianos E.V. Prevalence of viral markers among refugees from southern Albania: increased incidence of infection with hepatitis A, B and D viruses. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7(6): 553-558.
199. **Malamitsi-Puchner A**, Papacharitonos S, Sotos D, Tzala L, Psychogiou M, Hatzakis A, Evangelopoulou A, Michalas S. Prevalence study of different hepatitis markers among pregnant Albanian refugees in Greece. *Eur J Epidemiol* 1996; 12(3): 297-301.
200. **Roussos A**, Goritsas C, Pappas T, Spanaki M, Papadaki P, Ferti A. Prevalence of hepatitis B and C markers among refugees in Athens. *World J Gastroenterol* 2003; 9(5): 993-995.
201. **Kodra Y**, Sarmati L, Andreoni M, Bino S, Qyra S, Rezza G. Prevalence of HHV-8 infection in Albanian adults and association with HBV and HCV. *Eur J Epidemiol* 2004; 19(5): 467-469.
202. **Ulqinaku D**, Basho M, Hajdini M, Qyra S, Bino S, Kakarriqi E. Prevalenca e hepatiteve virale te gratë shtatëzëna në Shqipëri. (Surveillance systems for acute viral hepatitis in Albania). *Revista Mjekësore (Med J)* 2006; 3: 55-63.
203. **Levitt A**, Vorsters A, Emiroglu N, Goldstein S, Godal T, Kane M, Popovic D, Wiersma S, Van Damme P. Viral Hepatitis Prevention Board. Strengthening immunisation systems and introduction of hepatitis B vaccine in Central and Eastern Europe and the newly independent states. Ukraine, Kyiv 2004. Available from <http://www.vhpb.org>.
204. **Warris G**, Siddiqui A. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci* 2003; 3: 311-321.
205. **Papaevangelou V**, Hadjichristodoulou C, Cassimos D, Theodoridou M. Adherence to the screening program for HBV infection in pregnant women delivering in Greece. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 84.

206. **Hussain M**, Lok A.S.F. Mutations in the hepatitis B virus polymerase gene associated with antiviral treatment for hepatitis B. *J Viral Hepatitis* 1999; 6: 183-194.
207. **Guindon S**, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biol* 2003; 52(5): 696-704.
208. **Casemann W.H**, Meyer M, Kekulé A.S, et al. A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS7S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Procl Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2970-2974.
209. **Kato H**, Orito E, Gish R.G, et al. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes. *J Virol* 2002; 76(12): 6131-6137.
210. **Kingman J.F.C**. The coalescent. *Stoch Process Appl* 1982; 13: 235-248.
211. **Ratziu V**, Sayeg-Tainturier M.H, Nourani N, Poynard T. Pre-C mutations of the HBV. *Gastroenterol Clin Biol* 2002; 26: 509-513.
212. **Medley G.F**, Lindop N.A, Edmunds W.J, Nokes D.J. Hepatitis B virus endemicity: heterogeneity, catastrophic dynamics and control. *Nat Med* 2001; 7: 619-624.
213. **Kaneko S**, Miller R.H. Heterogeneity of the core gene sequence in a patient chronically infected with hepatitis B virus. *J Infect Dis* 1989; 160: 903-904.
214. **Mimms L**. Hepatitis B virus escape mutants: “pushing the envelope” of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1995; 21: 884-887.
215. **Seddigh-Tonekaboni S**, Waters J.A, Jeffers F, et al. Effect of variation in the common “a” determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen. *J Med Virol* 2000; 60: 113-121.
216. **Carman W.F**, Trautwein C, Van Deursen F.J, et al. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996; 24: 489-493.
217. **Colgrove R**, Simon G, Ganem D. Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication. *J Virol* 1988; 63: 4019-4026.

218. **Hsu H.Y**, Chang M.H, Liaw S.H, et al. Changes of hepatitis B surface antigen variants in carrier children before and after universal vaccination in Taiwan. *Hepatology* 1999; 30: 1312-1317.
219. **Melegari M**, Bruno S, Wands J.R. Properties of hepatitis B virus pre-S1 deletion mutants. *Virology* 1994; 199: 292-300.
220. **Locarnini S.A**. Hepatitis B virus surface antigen and polymerase gene variants: potential virological and clinical significance. *Hepatology* 1998; 27(1): 294-297.
221. **Ching-Lung L**, Dienstag J, Schiff E, Nancy W.Y, Aktins M, Hunt C, Brown N, Woessner M, Boehme R, Condreay L. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Inf Dis* 2003; 36: 687-696.
222. **Liu X**, Schinazi R.F. Hepatitis B virus resistance to lamivudine and its clinical implications. *Antiv Chem Chemoter* 2002; 13: 143-155.
223. **INSTAT**. Popullsia e Shqipërisë në vitin 2001.
224. **World Health Organization (WHO) Regional Office for Europe**. Progress report: humanitarian mission to Albania, April-August, 1997. *Unpublished*; prepared 1997.
225. **United Nations Development Program (UNDP)**. Albania human development report 1996. *Tirana* 1996.
226. **Government of Albania**, et al. Growth and poverty reduction strategy 2001-2004 [second draft]. 2001.
227. **United Nations Children's Fund (UNICEF) - Albania**. Multiple indicator cluster survey report: Albania. *Tirana* 2000.
228. **World Bank**. Albania: health sector reform during the transition. *World Bank, Washington, DC* 1992.
229. **Grenfell B.T**, Pybus O.G, Gog J.R, Wood J.L, Daly J.M, Mumford J.A, Holmes E.C. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science* 2004; 303: 327-332.
230. **Pybus O.G**, Charleston M.A, Gupta S, Rambaut A, Holmes E.C, Harvey P.H. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science* 2001; 292: 2323-2325.

231. **Pybus O.G**, Cochrane A, Holmes E.C, Simmonds P. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infect Genet Evol* 2005; 5: 131-139.
232. **Verbeeck J**, Maes P, Lemey P, Pybus O.G, Wollants E, Song E, Nevens F, Fevery J, Delport W, Van Der Merwe S, Van Ranst M. Investigating the origin and spread of hepatitis C virus genotype 5a. *J Virol* 2006; 80: 4220-4226.
233. **Salemi M**, De Oliveira T, Soares M.A, Pybus O.G, Dumans A.T, Vandamme A.M, Tanuri A, Cassol S, Fitch W.M. Different epidemic potentials of the HIV-1B and C subtypes. *J Mol Evol* 2005; 60: 598-605.
234. **Walker P.R**, Pybus O.G, Rambaut A, Holmes E.C. Comparative population dynamics of HIV-1 subtypes B and C: subtype-specific differences in patterns of epidemic growth. *Infect Genet Evol* 2005; 5: 199-208.
235. **Snapp K.W**, Holmes E.C, Young D.S, Bernard K.A, Kramer L.D, Ebel G.D. Declining growth rate of West Nile Virus in North America. *J Virol* 2007; 81: 2531-2534.
236. **Cottam E.M**, Haydon D.T, Paton D.J, Gloster J, Wilesmith J.W, Ferris N.P, Hutchings G.H, King D.P. Molecular epidemiology of the foot-and-mouth disease virus outbreak in the United Kingdom in 2001. *J Virol* 2006; 80(22): 11274-11282.
237. **Kitchen A**, Miyamoto M.M, Mulligan C.J. Utility of DNA viruses for studying human host history: case study of JC virus. *Mol Phylogenet Evol* 2007; 18: 18.