



Università di Pisa

**DIPARTIMENTO DI RICERCA TRASLAZIONALE E DELLE NUOVE
TECNOLOGIE IN MEDICINA E CHIRURGIA**

Corso di Laurea Specialistica in Medicina e Chirurgia

Tesi di Laurea

**STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE CRONICA DA
HBV IN PAZIENTE HBEAG NEGATIVO E
ANTI-HBE POSITIVO A BASSA REPLICAZIONE VIRALE**

Relatori:

Prof. Ferruccio Bonino

Prof.ssa Maurizia Rossana Brunetto

Dr. Piero Colombatto

Candidato:

Riccardo Gattai

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Classificazione tassonomica	2
1.2 Biologia del virus dell'epatite B dell'uomo (HBV)	3
1.2.1 Morfologia del virione	3
1.2.2 Genoma di HBV	4
1.2.3 Gene S / HBsAg	6
1.2.4 Gene PreC e C / HBcAg e HBeAg	8
1.2.5 Gene P / Polimerasi	9
1.2.6 Gene X / Proteina X	10
1.3 Ciclo replicativo	11
1.4 Eterogeneità virale	15
1.4.1 Varianti del gene S	15
1.4.2 Varianti del gene PreC / C	16
1.4.3 Varianti del gene P	18
1.4.4 Genotipi e sierotipi di HBV	19
1.5 Infettività	20
1.6 Patogenesi e storia naturale	21
1.7 Quadri clinici di epatite cronica	26
1.7.1 Epatite cronica HBeAg positiva	26
1.7.2 Epatite cronica anti-HBe positiva	27
1.8 Diagnosi	30
1.8.1 Diagnosi sierologica di primo livello	31
1.8.2 Diagnosi sierologica di secondo livello: caratterizzazione dell'infezione e identificazione del paziente con malattia epatica da HBV	33
1.9 Terapia	37

2. SCOPO DEL LAVORO	39
3. PAZIENTI E METODI	42
3.1 Casistica	42
3.2 Test sierologici	44
3.3 Elaborazione dei dati e analisi statistica	45
4. RISULTATI	46
4.1 Caratteristiche della casistica alla prima osservazione	46
4.2 Caratterizzazione dei portatori dopo 12 mesi di monitoraggio	47
4.3 Monitoraggio a lungo termine dei portatori inattivi (IC) e attivi con bassa replicazione (LV-AC)	50
4.3.1 Variazione dei livelli di HBsAg durante il monitoraggio	52
4.3.2 Fattori associati ai diversi esiti virologici nei Portatori Inattivi	53
4.3.3 Fattori associati a livelli di HBsAg >1000 IU/mL nei Portatori Inattivi	55
4.3.4 Fattori associati ai diversi esiti virologici nei Portatori Attivi con bassa viremia	56
5. DISCUSSIONE	58
6. CONCLUSIONI	63
7. RIASSUNTO	64
8. BIBLIOGRAFIA	67
9. RINGRAZIAMENTI	85

1. INTRODUZIONE

L'infezione da virus dell'epatite B (HBV) rappresenta uno dei maggiori problemi di salute a livello globale e una delle principali cause di malattia epatica, e, nonostante la presenza di un vaccino efficace prodotto con la tecnica del DNA ricombinante, ogni anno ci sono circa 1 milione di nuovi casi di infezione ed è stato stimato che le persone affette siano circa 350 milioni in tutto il mondo [1]. Il rischio di sviluppare quadri molto gravi di epatopatia, come la cirrosi, l'insufficienza epatica o l'epatocarcinoma (HCC), è nettamente aumentato nei pazienti con epatite cronica da HBV [2], infatti circa 500000 soggetti muoiono ogni anno per problematiche correlate all'infezione da HBV [3].

1.1 Classificazione tassonomica

Il virus dell'Epatite B (HBV) è il prototipo di una famiglia di virus, in costante aumento, chiamata Hepadnaviridae [4]. Sono una famiglia di virus a DNA con spiccato epatotropismo e uno spettro d'ospite molto ampio, comprendente mammiferi (incluso l'uomo) e volatili [5]. Si descrivono 2 generi :

- **Orthohepadnavirus** che include i virus infettanti i mammiferi :
 - o Virus dell'epatite B dell'uomo (HBV)
 - o Virus dell'epatite della scimmia lanosa (WMHBV) [6]
 - o Virus dell'epatite dello scoiattolo (GSHV) [7]
 - o Virus dell'epatite della marmotta americana (WHV) [8]
- **Avihepadnavirus** che include i virus infettanti gli uccelli:
 - o Virus dell'epatite B dell'anatra (DHBV) [9]
 - o Virus dell'epatite B dell'airone

5 nuovi virus sono stati clonati da anatre esotiche e dalla specie delle anatre [10].

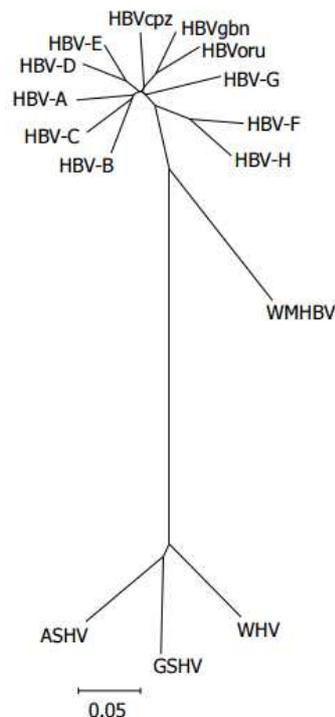


Figura 1 : Albero filogenetico degli Orthohepadnavirus [11]

1.2 Biologia del virus dell'epatite B dell'uomo (HBV)

1.2.1 Morfologia del virione

La forma infettiva di HBV è un virione sferico con diametro variabile compreso tra 42 e 47 nm, conosciuto come particella di Dane. È costituito da un doppio involucro racchiudente il genoma (Figura 2).

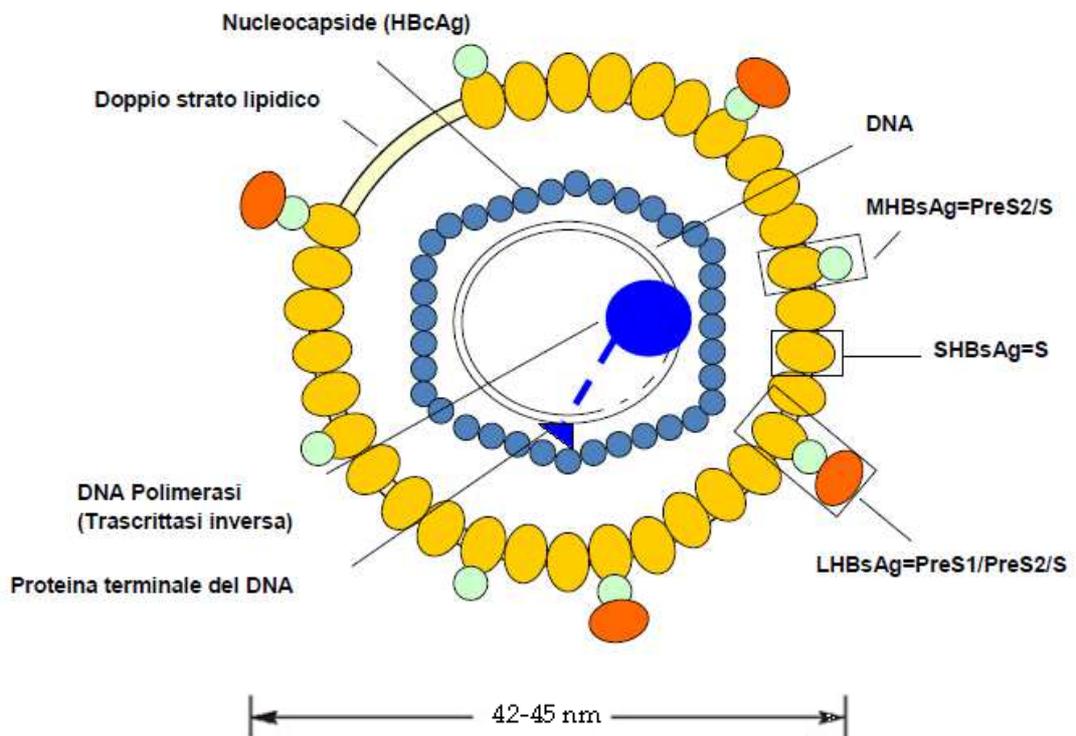


Figura 2 : Struttura del virione infettante di HBV

L'involucro esterno, chiamato **envelope**, è formato da 2 strati di fosfolipidi, derivanti dalla cellula ospite, e contiene 3 differenti proteine di superficie dotate di antigenicità HBsAg (Hepatitis B Surface Antigen) che possono essere distinte in base al peso molecolare in *small* (SHBsAg), *medium* (MHBsAg) e *large* (LHBsAg).

Le proteine di superficie sono proteine transmembrana di tipo II glicosilate, organizzate in multimeri stabilizzati da ponti disolfuro tra i residui di cisteina presenti nel dominio S [12] [13].

L'involucro interno è rappresentato dal **nucleocapside** presentante una struttura icosaedrica elettrondensa del diametro di 28 nm, costituito da circa 180 molecole della proteina core codificata con reattività antigenica HBcAg (Hepatitis B Core Antigen).

All'interno del nucleocapside è contenuta una singola copia di DNA genomico, circolare a doppio filamento incompleto, ad un'estremità del quale troviamo legata la polimerasi virale che ha anche attività di trascrittasi inversa.

1.2.2 Genoma di HBV

Il genoma è costituito da una piccola molecola di DNA circolare con un doppio filamento incompleto (uno a polarità positiva e uno a polarità negativa) formato da circa 3200 paia di basi. L'approssimazione è dovuta al fatto che si ha una variabilità intergenotipica.

Il filamento a polarità positiva si estende solamente per 2/3 della lunghezza del DNA, interrompendosi all'estremità 3' in porzioni variabili.

Alle sue due estremità si descrivono due regioni ridondanti di 8-9 nucleotidi essenziali per la replicazione virale, conosciute come regioni R [14] [15] [16]. Il filamento a polarità negativa copre l'intera lunghezza del DNA e all'estremità 5' presenta un residuo oligomerico di RNA che deriva dall'RNA pre-genomico (pgRNA) legato covalentemente. A questo filamento troviamo legata la polimerasi virale tramite un legame fosforico [17].

L'organizzazione del genoma (Figura 3) è molto compatta: le regioni codificanti sono infatti parzialmente sovrapposte; questo permette al virus di codificare per un numero elevato di proteine nonostante le ridotte dimensioni dell'acido nucleico.

Il DNA virale ha 4 regioni codificanti distinte, dette Open Reading Frames (ORFs) [18]:

- S codifica per le proteine dell'envelope
- P codifica per la polimerasi virale
- C codifica per la proteina core
- X codifica per la proteina X

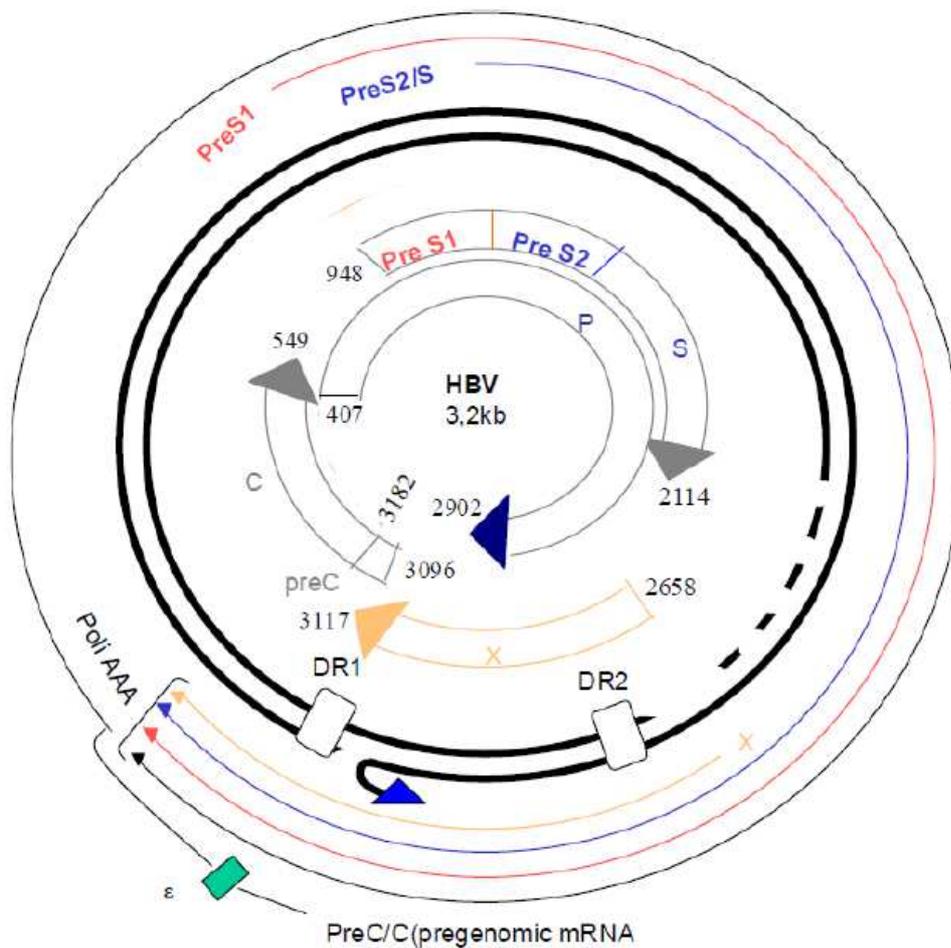


Figura 3: Organizzazione del genoma di HBV

Si notino il doppio filamento incompleto estremamente compatto e le regioni codificanti sovrapposte

1.2.3 Gene S / HBsAg

Il gene S codifica per tre differenti proteine di superficie che in base al peso molecolare sono denominate *small* (S), *medium* (M) e *large* (L).

Ha una lunghezza compresa tra 389 e 400 codoni, a seconda del genotipo. Ha tre codoni di inizio dai quali originano le proteine per i domini S, PreS1 e PreS2, presentanti lo stesso dominio C-terminale ma con differenze all'estremità N-terminale [19].

Numerosi fattori hanno ruolo importante nella regolazione della trascrizione, agendo su regioni *enhancer* (promotorici) specifiche per ciascuna proteina. Per la sola proteina L è presente anche una TATA box che funziona come *promoter*.

La traduzione degli mRNA avviene nel reticolo endoplasmatico e dà origine alle proteine:

- *small*, composta da 226 amminoacidi
- *medium*, composta da 281 amminoacidi; quelli in più rispetto alla *small* sono codificati dalle regioni PreS2 e si presentano all'estremità N-terminale
- *large*, composta da 334-345 amminoacidi; quelli in più rispetto alla *small* sono codificati dalle regioni PreS1 e PreS2, e si localizzano all'estremità N-terminale

Le 3 proteine S formano l'envelope della proteina di Dane. La S e la L sono fondamentali per la produzione del virione in quanto aventi ruolo nell'assemblaggio, nella secrezione e nell'infettività. Il ruolo della proteina M rimane ancora da definire in quanto l'assenza di essa non altera la morfogenesi e l'infettività [20].

Oltre ai virioni completi, nel siero dei pazienti infetti c'è un eccesso di particelle difettive, composte dal solo envelope senza potere infettante. Queste particelle sono strutture subvirali, senza nucleocapside, con diametro di 20 nm, solitamente di forma sferoidale o filamentosa (Figura 4), che vengono formate a livello dell'apparato di Golgi [21].

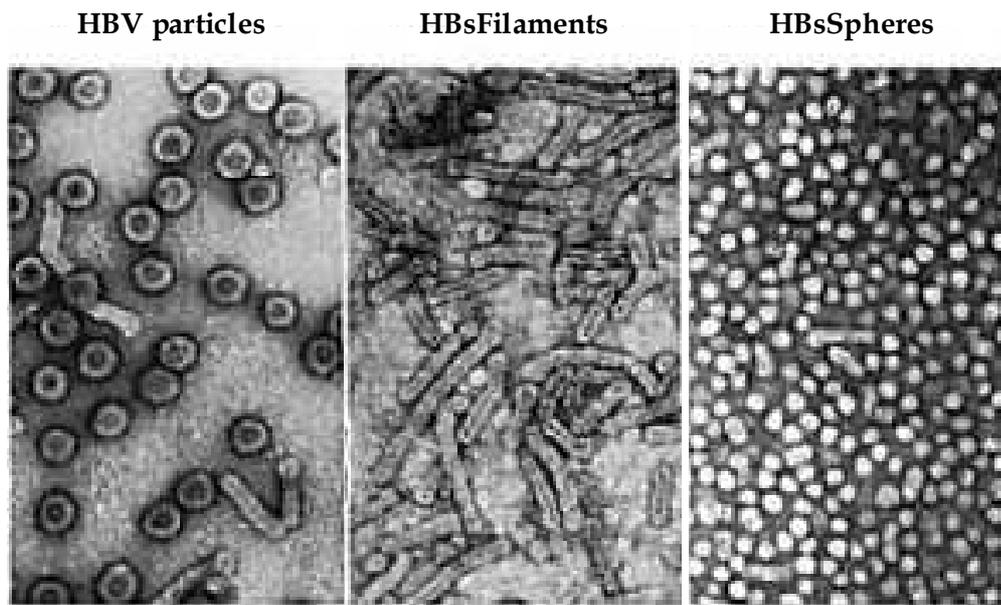


Figura 4: Morfologia dei virioni completi e delle particelle difettive [22]

Il rapporto dei virioni completi e le particelle difettive è nettamente a favore di quest'ultime, che sono da 10^2 a 10^5 volte più numerose dei virioni nel circolo periferico. Possono raggiungere concentrazioni di centinaia di μg per ml di siero. I virioni sono espressione della replicazione mentre le particelle subvirali sono derivanti dalla trascrizione di singoli ORF del cccDNA e dalla traduzione di specifici mRNA.

Ognuna delle 3 proteine è presente in percentuali diverse nell'envelope del virione e delle particelle subvirali difettive (forma filamentosa e sferica) (Tabella 1) [23]:

	Virione	Particella difettiva	
	Completo	Filamentosa	Sferica
Proteina S	70%	70%	>70%
Proteina M	20%	20%	10%
Proteina L	10%	10%	1%

Tabella 1: distribuzione percentuale delle 3 proteine dell'envelope

Ai fini maturativi è di fondamentale importanza il mantenimento della stechiometria tra proteine L e S, poiché l'eccesso della prima comporterebbe un accumulo nel complesso di Golgi di HBsAg, impedendone la secrezione.

Questo fenomeno si può verificare a causa di mutazioni della regione PreS (sia pre-S1 che pre-S2) che comportano uno sbilanciamento del rapporto tra le varie proteine.

1.2.4 Gene PreC e C / HBcAg e HBeAg

L'ORF PreC / C contiene 2 domini diversi che si caratterizzano per 2 codoni di inizio della traduzione, distanti 28 codoni l'uno dall'altro.

Il trascritto che origina dal codone di inizio interno codifica per HBcAg, la proteina del core [24], essenziale per la formazione del nucleocapside e implicata nei processi assemblativi, di reclutamento del pgRNA e di costituzione del complesso pgRNA-polimerasi virale, essenziale per avviare la trascrizione inversa [25] [26] [27].

La traduzione del trascritto più lungo dà origine al polipeptide PreC che differisce dalla proteina del core per la presenza di una sequenza leader di 29 amminoacidi all'estremità N-terminale che ne permette il trasporto nel reticolo endoplasmatico liscio, da cui, a seguito del clivaggio dei primi 19 amminoacidi dell'estremità C-terminale, viene secreto in circolo come proteina HBeAg.

L'HBeAg non svolge né un ruolo strutturale né un ruolo funzionale ai fini della replicazione virale, ma nonostante questo, la sua produzione e secrezione sono finemente regolate a livello trascrizionale e traduzionale [28] [29] [30].

Bisogna, inoltre, sottolineare il fatto che è una proteina virale conservata in tutti gli Hepadnaviridae. Tali evidenze (la fine regolazione e la presenza in tutti i virus della famiglia) suggeriscono un ruolo importante di HBeAg nella biologia degli Hepadnaviridae, soprattutto per quello che riguarda l'interazione tra virus e ospite, andando a modulare la risposta immune di quest'ultimo [31] [32].

Sebbene HBeAg e HBcAg presentino sequenze amminoacidiche omologhe, si associano a reattività antigeniche diverse e la risposta immunologica nei loro confronti è regolata indipendentemente.

L'HBcAg è estremamente immunogenico (0,025 mg di HBcAg stimola produzione di anticorpi) e funziona sia come antigene T-cell indipendente che T-cell dipendente; è stato dimostrato che innesca preferenzialmente risposte di tipo Th1 [33].

La risposta immune nei confronti di HBeAg, invece, è rigorosamente T-cell dipendente [33] e preferenzialmente, ma non esclusivamente, attiva risposte di tipo Th0 e/o Th2 che stimolano una reazione immune tollerogena [34].

1.2.5 Gene P / Polimerasi

La replicazione di HBV si incentra sull'azione della polimerasi virale, proteina multifunzionale codificata dal gene P, che corrisponde ad un 80% circa dell'intera sequenza genomica di HBV [35].

È composta da quattro domini differenti con specifiche attività enzimatiche:

- il primo, localizzato all'estremità N-terminale, denominato primasi o TP (Terminal Protein), lega covalentemente la sequenza di riconoscimento all'estremità 5' del pgRNA, garantendo l'inizio della sintesi della catena negativa dell'HBV-DNA [36] [37];
- il secondo agisce da *spacer*, anche se non si esclude che possa avere ulteriori funzioni attualmente non note;
- il terzo è la trascrittasi inversa (RT) dotata di attività polimerasica DNA- e RNA-dipendente [38], in cui si descrivono 5 regioni (A-E) a livello delle quali si possono verificare mutazioni che vengono selezionate in corso di trattamento con analoghi nucleos(t)idici ad azione antivirale;
- il quarto ha attività ribonucleasica ed è dominato ribonucleasi H (RH) [39].

1.2.6 Gene X / Proteina X

La proteina X è codificata dal gene X tramite la trascrizione di un mRNA di 0,8 kb. L'ORF X è parzialmente sovrapposta alla regione P (a livello N-terminale) e alla regione PreC/C (all'estremità C-terminale) [18].

Al momento il ruolo della proteina X non è stato ancora compreso pienamente, tuttavia gli sono state attribuite attività regolatoria sulla trascrizione dei geni virali, senza un legame diretto al DNA [40], nella regolazione del ciclo cellulare, nell'inibizione dei processi riparativi e nella regolazione del meccanismo apoptotico [41] [42] [43].

1.3 Ciclo replicativo

La replicazione virale necessita dell'interazione virus-ospite ed è caratterizzata da una cascata di processi specifici e consequenziali, i primi dei quali riguardano l'adesione del virione sull'epatocita e il conseguente ingresso all'interno della cellula.

Solo negli ultimi tempi sono stati meglio compresi i meccanismi che regolano l'adesione, il riconoscimento e l'internalizzazione virale (Figura 5).

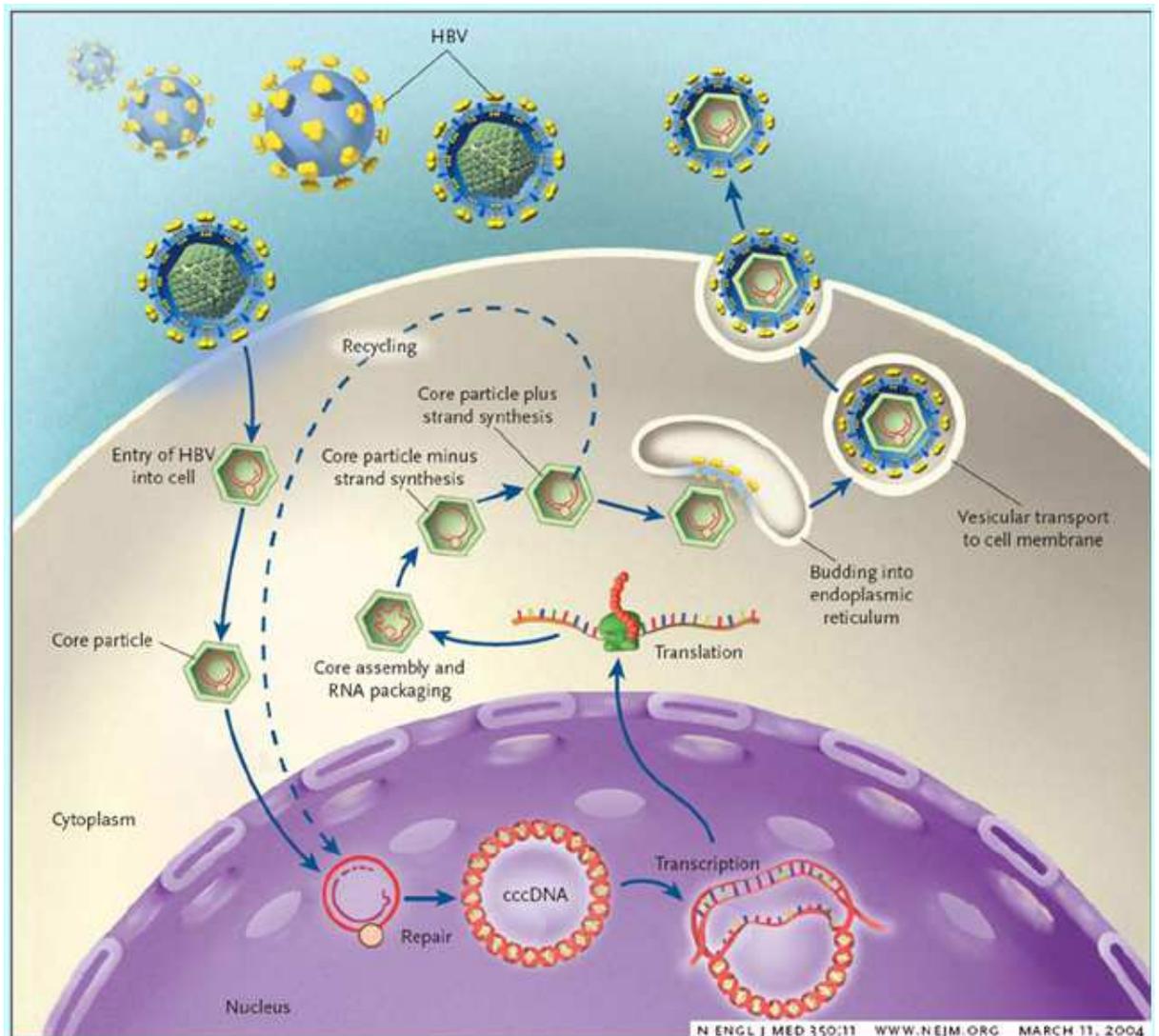


Figura 5: Pathway replicativo di HBV [44]

Nella fase di adesione del virus alla cellula ospite è stata dimostrata l'importanza della porzione N-terminale della proteina *large* [45] [46], che quando mutata rende meno efficiente il processo. Più recentemente è stato scoperto che il polipeptide cotrasportatore sodio-taurocolato (NTCP), un trasportatore epatico degli acidi biliari, localizzato sulla membrana sinusoidale, oltre che rivestire un ruolo fondamentale nell'omeostasi biliare, agisce da recettore funzionale per HBV e HDV [48], e nel caso del primo il legame avviene a livello del Pre-S1 [47]. È stato dimostrato che inducendo mutazioni del sito di legame su NCTP si determinano interferenze tali che riducono l'infettività virale, aprendo prospettive future nell'ambito terapeutico.

Il meccanismo di internalizzazione nella cellula si è dimostrato essere quello dell'endocitosi. A differenza di altri virus (come adenovirus e parvovirus), non si hanno alterazioni strutturali conseguenti al processo endocitico quindi non è possibile distinguere capsidi di HBV che sono stati endocitati da quelli neosintetizzati. [49]. I capsidi, una volta liberati dall'envelope, interagiscono con i microtubuli dell'epatocita che li trasportano fino al centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC), localizzato in regione peri-nucleare.

Il passaggio successivo dei capsidi attraverso il complesso del poro nucleare (NPC), grossa struttura proteica costituita da 30 differenti proteine chiamate nucleoporine (Nups), è mediato dai recettori nucleari di trasporto chiamati importina α e β . Il primo si lega all'estremità C-terminale del capside virale, che presenta anche un segnale di localizzazione nucleare (NLS), e interagisce con importina β , che facilita l'aggancio del complesso di importazione al NPC e il conseguente passaggio attraverso il poro nucleare [50].

A livello nucleare avviene il completamento del tratto a singola elica del DNA ad opera delle Polimerasi dell'ospite con successiva conversione del DNA circolare aperto in DNA circolare chiuso covalentemente (*Supercoiled DNA* o *cccDNA*), che si assembla con proteine istoniche sottoforma microsomiale.

Il cccDNA serve come *template* trascrizionale per la RNA polimerasi II dell'ospite che trascrive:

- gli RNA messaggeri sub-genomici, essenziali per la sintesi delle proteine virali

- l'RNA pre-genomico (pg-RNA), che serve come stampo per la produzione di nuove molecole di DNA virale, ma anche da mRNA per la produzione delle proteine del core e della polimerasi.

La successiva traduzione degli RNA virali avviene indipendentemente in sedi diverse della cellula: l'mRNA-subgenomico nel reticolo endoplasmatico portando alla produzione dell'envelope e della proteina X; il pgRNA direttamente nel citoplasma, dove viene anche incapsidato dalle proteine del core in una struttura denominata pro-virione, nel cui interno è retroscritto in DNA ad opera della DNA-polimerasi RNA-dipendente virale, che ricordiamo essere collocata all'estremità 5' del pg-RNA in corrispondenza di una struttura secondaria chiamata "epsilon" (ϵ) che funge da sito di riconoscimento (pregenomic encapsidation signal) [51] [52] (Figura 6).

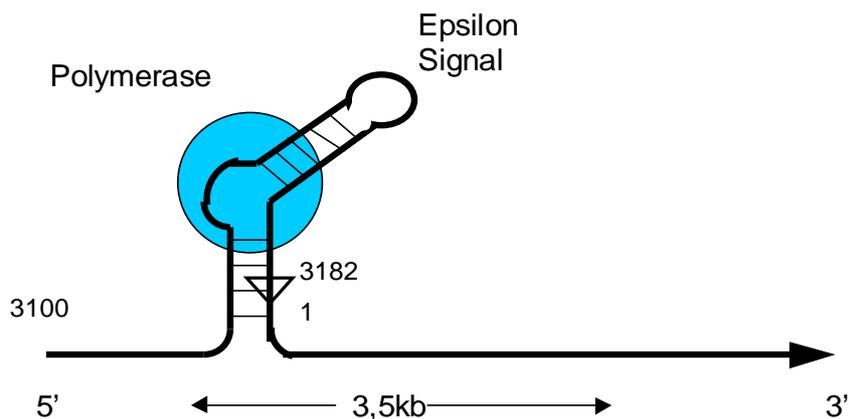


Figura 6 : la polimerasi virale (in blu) è attaccata all'epsilon del pgRNA

Dopo la produzione di un complesso intermedio RNA/DNA, la polimerasi virale rimuove lo stampo di pg-RNA grazie alla funzione ribonucleasica e promuove la sintesi (parziale) della catena complementare di DNA (attività di polimerasi DNA-dipendente). La sintesi del filamento S (+) non sarà completa perché le proteine del nucleocapside si legano all'elica L (-), quindi il genoma virale della progenie sarà circolare, rilassato e parzialmente bicatenario [53].

Successivamente al completamento dell'assemblaggio del nucleocapside, si ha l'acquisizione dell'envelope dalle membrane del reticolo endoplasmatico in cui sono inserite le glicoproteine virali di superficie. Il virione completo può quindi essere escretto dall'epatocita.

In contemporanea al processo replicativo l'infezione da HBV può intraprendere una via evolutiva parallela all'interno dell'epatocita: l'integrazione di più o meno ampie sequenze nucleotidiche del genoma virale all'interno del genoma della cellula ospitante. Nonostante non sia un processo essenziale per la replicazione, rappresenta comunque un fenomeno che avviene costantemente e precocemente nella storia naturale dell'infezione. L'integrazione non avviene in siti specifici e può portare in alcuni casi all'attivazione e/o all'alterazione di particolari geni implicati nel controllo e nella regolazione del ciclo cellulare, rappresentando un potenziale meccanismo patogenetico nell'epatocarcinogenesi [54] [55].

1.4 Eterogeneità virale

HBV ha una spiccatissima tendenza alla formazione di popolazioni virali eterogenee e “quasi specie” virali, visto che la trascrittasi inversa, implicata nella sintesi del filamento di DNA nascente ha scarsa attività di proof-reading, quindi non riesce a correggere eventuali errori (delezioni, inserzioni e sostituzioni nucleotidiche). La probabilità di errore è compresa tra 1.4 e 2.3×10^{-4} sostituzioni nucleotidiche per sito per anno [56], risultando 10 volte maggiore che in altri tipi di virus a DNA in cui non è presente un intermedio replicativo ad RNA.

Data l'organizzazione estremamente compatta del genoma di HBV, con regioni codificanti parzialmente sovrapposte, anche mutazioni puntiformi possono alterare in modo rilevante la regolazione e/o la sintesi proteica, quindi il numero di mutazioni tollerato senza che il virus perda infettività e capacità replicativa è piuttosto limitato [57], pertanto solo una quota estremamente ridotta di nuove “quasi specie” potrà diventare una popolazione virale dominante.

La selezione di un “mutante” dipenderà dalla capacità replicativa e dagli eventuali vantaggi selettivi, come la capacità di sfuggire alla pressione immunologica e/o ambientale (ad esempio durante una terapia antivirale con analoghi nucleos(t)idici) [58].

A tale proposito sono state identificate, a carico dei geni S, C e Pol, alcune mutazioni di sicura rilevanza clinica, per le implicazioni sulla persistenza virale e sulla patogenesi [59].

1.4.1 Varianti del Gene S

Le proteine dell'envelope dell'HBV (HBsAg), codificate dalle regioni PreS/S della ORF S, rappresentano un bersaglio di primaria importanza della risposta anticorpale (anti-HBs) neutralizzante [60] [61].

Importanti sono le mutazioni che si verificano a livello del determinante antigenico “a” (124-147aa) di HBsAg, che rappresenta sia l'epitopo

maggiormente riconosciuto dalle metodiche commerciali utilizzate nella determinazione di HBsAg [62], che il target del vaccino ricombinante [63].

Le selezioni di varianti virali in tale regione potrebbe portare all'emergenza di virus in grado di sfuggire al vaccino, i cosiddetti "escape mutants". Il primo isolato virale in cui venne documentata questa condizione presentava una sostituzione dell'amminoacido Glicina con Arginina in posizione 145 (G145R) e fu descritto in Italia in un bambino infettatosi dalla madre nonostante avesse sviluppato anticorpi anti-HBs a seguito della profilassi vaccinale [64]. Gli studi epidemiologici non hanno però dimostrato una tendenza significativa alla selezione di varianti di questo tipo, tale da determinare la compromissione delle campagne vaccinali a livello globale.

Successivamente sono state scoperte altre mutazioni che determinano varianti in grado di eludere la risposta immune [65], ma G145R resta la più comune in assoluto. Oltre alla regione S anche le porzioni Pre-S1 e Pre-S2 sono oggetto di mutazioni, spesso evidenziate in portatori cronici d'infezione [66]; la più comune di questo secondo gruppo riguarda la regione Pre-S2 e modifica un epitopo presentato in associazione con le molecole di MHC di classe I, target dei linfociti T citotossici.

Si ritiene quindi che tali mutanti siano selezionati dalla pressione immunologica e che siano importanti nella persistenza virale, potendo probabilmente condizionare anche la patogenesi del danno epatico [67] per l'accumulo di HBsAg negli epatociti, che da luogo alle cosiddette "ground glass cells" (cellule a vetro smerigliato) [68].

1.4.2 Varianti del Gene PreC/C

La regione PreC/C del genoma di HBV codifica la sintesi della proteina nucleocapsidica (HBcAg) e della proteina circolante "e" (HBeAg), la cui secrezione dipende dall'espressione di una specifica sequenza segnale codificata dalla regione PreC e può essere modulata sia a livello trascrizionale [29] che traslazionale [69] [67].

La produzione di HBeAg è inoltre modulata a livello trascrizionale da sequenze regolatrici quali il "basic core promoter"(BCP) e la "core upstream regulatory sequence"(CURS) [71]. Mutazioni a livello di queste sequenze regolatrici, influenzando sul rate trascrizionale del Pre-core m-RNA, sono in grado di modulare, ma non di bloccare, la sintesi dell'HBeAg [71]. Gli studi di storia naturale hanno dimostrato come la selezione di varianti difettive per la secrezione di HBeAg (rappresentata, ad esempio nell'area Mediterranea, per il 90% da mutanti G1896A [69]) sia una costante nel caso dell'infezione e malattia cronica da HBV. In particolare, tali mutanti iniziano ad emergere non appena si attiva una specifica risposta immune, mentre divengono la popolazione prevalente nella fase HBeAg negativa dell'infezione. Si ritiene che le varianti HBeAg difettive siano una strategia virale volta a garantire la persistenza dell'infezione e replicazione in presenza di una specifica risposta immune antivirale.

1.4.3 Varianti del Gene P

Le mutazioni del gene P, codificante per la polimerasi virale, sono state descritte a partire dall'introduzione della terapia con gli analoghi nucleos(t)idici, la cui azione si esplica attraverso l'interferenza con l'attività di questo enzima. Durante tale terapia si possono selezionare mutazioni nel sito catalitico della polimerasi che determinano la resistenza a tali farmaci. La prima ad essere stata identificata è la sostituzione dell'amminoacido metionina con una valina o isoleucina in posizione 204 (M204V o M204I) nel dominio C dell'enzima [72], in pazienti sottoposti a lamivudina. Questa mutazione altera il legame del farmaco col sito catalitico della polimerasi impedendone così l'attività di blocco.

In generale la selezione dei mutanti è dipendente dalla:

- fitness replicativa
- disponibilità di uno spazio cellulare per la diffusione della variante
- capacità di controllo immune endogeno dell'ospite.

1.4.4 Genotipi e sierotipi di HBV

HBV è oggi classificato in 8 genotipi che differiscono tra di loro per almeno l'8%, sulla base dei determinanti antigenici di superficie. A loro volta i genotipi si suddividono in sottogenotipi, che differiscono tra loro per il 4% e mostrano una distribuzione prevalente diversa a seconda dell'area geografica [73] [74].

I genotipi A-H con i relativi sottotipi e distribuzione geografica sono sintetizzati nella tabella sottostante (Tabella 2):

GENOTIPI	SIEROTIPI	DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA
A	adw2, ayw1	Nord ed Est Europa, Nord America, Filippine Hong Kong, Africa centrale
B	Adw2, ayw1	Sud-Est Asia, Cina, Giappone
C	ayr, adrq-, adrq+, adw2	Sud-Est Asia, Cina, Giappone
D	adw2, ayw3	Bacino del Mediterraneo, Asia centrale e India
E	ayw4	Africa sub-Sahariana
F	adw4q	America Latina, Polinesia
G	adw2	Francia, USA Solitamente in confezione con genotipo A
H		Messico e America Latina

Tabella 2 : Distribuzione geografica dei genotipi e sottogenotipi



Figura 8: Distribuzione geografica dei genotipi di HBV [11]

1.5 Infettività

HBV è un virus estremamente infettivo. L'infezione può essere trasmessa sia attraverso il sangue che con gli altri liquidi biologici ed è molto frequente che avvenga tramite contatti interpersonali in ambito familiare.

Nei paesi ad elevata endemia (Africa, Cina e sud-est asiatico) la probabilità di esposizione ad HBV nell'arco della vita supera il 60% e l'infezione si trasmette soprattutto per via verticale, quindi da madre a figlio, in epoca perinatale [75].

Nelle regioni ad endemia intermedia (Bacino del Mediterraneo, Europa orientale) il rischio di infezione per ogni soggetto varia dal 20 al 60% e la trasmissione avviene frequentemente per via orizzontale, tramite contatti intimo-sessuali e l'uso comunitario di oggetti contaminati (quali possono essere strumenti di igiene personale come rasoi, spazzolini da denti, etc..) [76] [77]. La diffusione dell'infezione all'interno dello stesso nucleo familiare è frequente.

Infine nei paesi occidentali a bassa endemia (tra cui si colloca attualmente anche l'Italia), in cui meno del 20% della popolazione è esposto al virus nel corso della vita, la trasmissione interessa prevalentemente gruppi a rischio come tossicodipendenti, soggetti con promiscuità sessuale, personale sanitario, residenti in istituti e nuclei familiari dei quali entra a far parte un soggetto portatore cronico di HBV (ad esempio a seguito di adozione) [78] [79].

1.6 Patogenesi e storia naturale

HBV non essendo direttamente citopatico [79] produce un'infezione che non si associa necessariamente con un danno epatico. Questo insorge quando si ha la risposta immunitaria contro il virus.

L'espressione degli antigeni virali in associazione con gli antigeni di istocompatibilità (HLA) sulla membrana epatocitaria porta al riconoscimento degli stessi antigeni da parte del sistema immune, seguito da innesco della risposta cellulo-mediata e umorale [80] [81]. Nei soggetti immunocompetenti in cui si sviluppa una risposta efficace rivolta verso gli epitopi virali del nucleocapside (HBcAg, HBeAg), dell'envelope (HBsAg) e della polimerasi, si osserva:

- l'inibizione mediata da citochine, quali IFN-gamma e TNF-alfa, della replicazione virale con caduta dei livelli di HBV-DNA circolante
- una reazione infiammatoria epatica cellulo-mediata che determina la clearance di un numero significativo di epatociti infettati, seguita poi dalla progressiva riduzione/scomparsa del danno necroinfiammatorio
- controllo dell'infezione con sviluppo di immunità umorale neutralizzante (anti-HBs).

Questa situazione solitamente è osservata nei casi di epatite acuta che esitano in guarigione, mentre, qualora la risposta immune non sia sufficientemente efficace, la persistenza dell'infezione attiva da HBV determina un'epatite cronica con sviluppo più o meno rapido di fibrosi e progressione in cirrosi epatica.

Se il soggetto infettato non riconosce come estranei gli antigeni virali a causa dell'immaturità (es. esposizione durante vita intrauterina) o della compromissione del sistema immune (congenita o acquisita), si instaura una condizione di tolleranza nei confronti dell'HBV che può replicarsi ad alti livelli in assenza di segni bioumorali e istologici di danno epatico. Questa è una condizione molto frequente in bambini infettati per via verticale da madri HBeAg positive. Infatti, è stato dimostrato come l'esposizione gestazionale all'HBeAg prodotto dall'HBV materno induca nel feto la deplezione timica dei linfociti deputati al riconoscimento di antigeni non autologhi [82]. Si instaura, pertanto, nel neonato una condizione di tolleranza immunologica nei confronti di HBeAg e HBcAg, che

rappresentano i principali target immunologici. Questa condizione potrà essere mantenuta per molti anni con persistenza di elevati livelli dei marcatori di replicazione (HBeAg, HBV-DNA), associata alla negatività dei marker di danno virus-indotto (IgM anti-HBc) [75] [77] [83] e alla normalità degli enzimi di citolisi epatica.

Ad un determinato momento nel corso della storia naturale dell'infezione, può iniziare il riconoscimento degli antigeni virali da parte del sistema immunitario con il conseguente tentativo di controllo dell'infezione che si esplica con meccanismi analoghi a quelli già descritti nel contesto dell'epatite acuta autolimitantesi:

- blocco della replicazione virale citochino-mediata
- eliminazione degli epatociti infetti [80] [81]
- richiamo dei linfociti attivati

Tuttavia, la minor efficienza e l'assenza di un'azione sincronizzata tra le diverse attività immunologiche, impedisce di raggiungere un adeguato controllo sull'infezione da HBV a una quota significativa di pazienti. In essi, il continuo richiamo nel fegato di linfociti attivati, ma poco efficaci nel determinare una significativa riduzione del carico infettivo, rappresenta il principale momento patogenetico del danno epatico.

Tale fase di attivazione immune può persistere per molti anni con un'alternanza di remissioni e riacutizzazioni che talvolta hanno cadenze periodiche [84]. È in questo contesto che per effetto della pressione immunologica vengono selezionate le varianti virali con mutazioni in grado di evitare la risposta immune alterando gli epitopi bersaglio della risposta immunitaria cellulo-mediata o arrestando la sintesi di proteine riconosciute dal sistema immune. Quest'ultima modalità è quella associata alla persistenza della malattia nei pazienti con epatite cronica B, HBeAg negativa / anti-HBe positiva [85], legata alla selezione delle varianti del PreC inizialmente descritte nei pazienti con infezione sostenuta dal genotipo D provenienti dal bacino del Mediterraneo [86]. La mancata produzione di HBeAg in queste varianti è dovuta principalmente alla mutazione G1986A della regione PreC, in più del 95% dei casi, che determina uno stop traslazionale con

conseguente arresto della sintesi della proteina [69]. Questo tipo di mutante è stato evidenziato nelle fasi di massima esacerbazione dei fenomeni di immuno-eliminazione precedenti la sierconversione HBeAg → anti-HBe, e costituisce la popolazione virale prevalente nella forma anti-HBe positiva dell'epatite cronica B [87]. Altre mutazioni, in particolare quelle del BCP, che si riscontrano soprattutto nei pazienti orientali con infezione sostenuta dai genotipo B e C, sono responsabili della minor della produzione dell'HBeAg attraverso una riduzione dell'attività trascrizionale [88].

Quindi, per quanto finora detto, la sierconversione HBeAg/anti-HBe non rappresenta sempre il segnale di un acquisito controllo immune sulla replicazione virale, perché può essere dovuta al selezionarsi di varianti HBeAg difettive a causa della pressione immune. In questo caso i livelli viremici tendono ad essere più bassi (valore medio 5 Log₁₀ IU/mL, range 4-7 Log₁₀ IU/mL) e fluttuanti, rispetto a quelli osservati nella fase HBeAg positiva (valore medio 6 Log₁₀ IU/mL, range 5-9 Log₁₀ IU/mL). Talvolta, nel corso del follow-up del paziente con epatite cronica B anti-HBe positiva, i livelli di HBV-DNA circolanti possono addirittura risultare inferiori ai limiti di sensibilità delle metodiche di laboratorio. Ciò era particolarmente vero quando erano in uso le tecniche di semplice ibridizzazione molecolare (sensibilità 5 Log₁₀ IU/mL), in tal caso la positività a basso titolo del marcatore di danno HBV indotto (IgM anti-HBc tra 0.200 e 0.800 IMx index) poteva rilevare la persistenza di danno epatico.

Va infine ricordato che, in un certo numero di casi, il passaggio dalla fase di tolleranza a quella di attivazione può segnare lo sviluppo di un controllo immune efficace, che si caratterizza per:

- la sierconversione HBeAg → anti-HBe
- la drastica riduzione dei livelli replicativi (HBV-DNA persistentemente <2000 IU/mL)
- la normalizzazione delle transaminasi

Quando questa condizione si mantiene costante nel tempo, il paziente viene definito **portatore inattivo** (Inactive Carrier, IC) di infezione da HBV. In questi soggetti il rischio di riattivazione è estremamente basso, ma può diventare

significativo in caso di trattamento immunosoppressivo o chemioterapico [82],
che riduce l'efficienza del sistema immune.

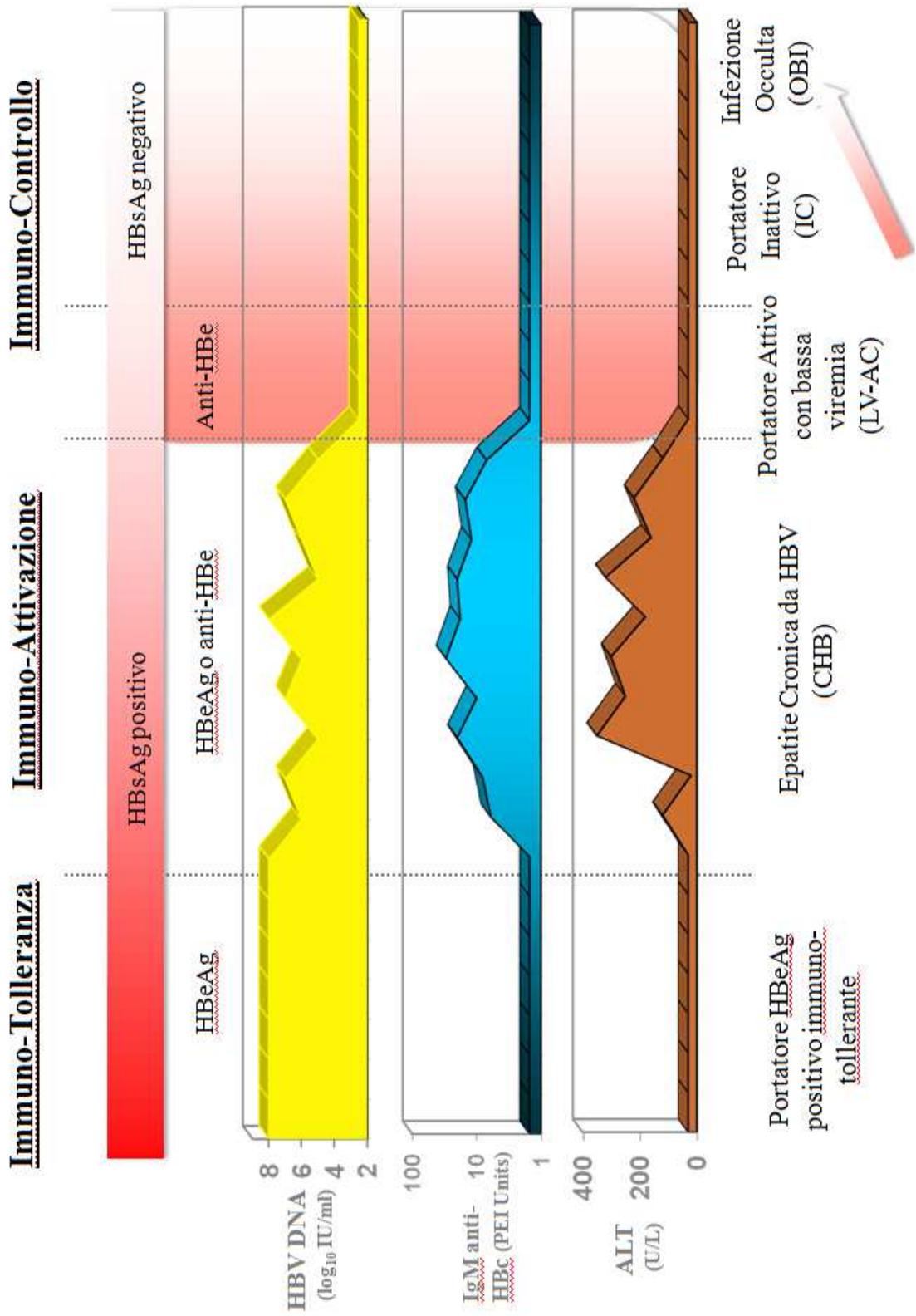


Figura 9: Storia naturale dell'infezione cronica da HBV

1.7 Quadri clinici di epatite cronica

Negli ultimi decenni, in Italia, una serie di fattori epidemiologici hanno contribuito a modificare sia la prevalenza assoluta dell'epatite cronica B che la prevalenza relativa delle due forme, HBeAg positiva e anti-HBe positiva.

Fino agli anni 70 c'era una prevalenza della forma HBeAg positiva, che rappresentava più del 55% dei casi cronici. Attualmente in Italia il 10-12% delle epatiti croniche di nuova diagnosi sono causate dall'HBV e circa il 90% è anti-HBe positiva.

A questo cambiamento epidemiologico hanno contribuito sia la riduzione dei nuovi casi di infezione sia l'aumentata accuratezza diagnostica con la quale sono identificati i pazienti anti-HBe positivi.

1.7.1 Epatite cronica HBeAg positiva

L'infezione perinatale con virus "wild-type" generalmente induce una lunga fase di immuno-tolleranza, già descritta come una fase con viremia elevata in assenza di attivazione immunologica e danno necro-infiammatorio [89].

Solitamente nella fase dell'adolescenza la maggior parte dei portatori passa spontaneamente alla fase di immuno-attivazione sviluppando un danno epatitico. In assenza di ciò si può arrivare ad osservare, in una minoranza di casi, pazienti adulti che rimangono immuno-tolleranti per tempi più lunghi.

Circa il 50-70% dei pazienti italiani giovani adulti, HBeAg positivi alla diagnosi, sieroconverte spontaneamente nel corso di un follow-up di 5-10 anni, con normalizzazione delle transaminasi e termine del processo necroinfiammatorio [90]. Fattori predittori positivi sono: gli elevati livelli di transaminasi, il sesso femminile ed la maggiore età.

Coloro che non va incontro a siero conversione spontanea, mantengono un'attività necroinfiammatoria marcata con frequenti episodi di esacerbazione necrotica, che associa ad un elevato rischio di progressione della malattia. È stato stimato che il tasso annuale di progressione a cirrosi sia del 2-5.5% e che

l'incidenza annua di complicanze cliniche della cirrosi (ittero, ascite, sanguinamento di varici, encefalopatia epatica, sindrome epato-renale) e di epatocarcinoma sia rispettivamente del 3.3% e del 2%. [90].

1.7.2 Epatite cronica anti-HBe positiva

Gli studi clinici che hanno caratterizzato il profilo dell'epatite cronica B anti-HBe positiva sono stati svolti prevalentemente nel bacino del Mediterraneo, area ove vi è una netta prevalenza del genotipo D, nel quale la mutazione G1896A a livello del Pre-C è la principale responsabile della riduzione della sintesi dell'HBeAg, che è alla base di questa variante clinica dell'epatite B.

Solitamente si tratta di soggetti che hanno acquisito l'infezione in epoca infantile, come è suggerito dalla:

- frequente presenza dell'infezione da HBV a livello familiare
- assenza di fattori di rischio maggiori, come l'esposizione parenterale e i rapporti sessuali
- storia di pregressa HBeAg positività [91].

In questa tipologia di pazienti l'epatite cronica decorre quasi sempre in maniera silente anche per 30-40 anni, raggiungendo lo stadio cirrotico ad un'età media di 45 anni; successivamente circa il 25% progredisce in una decade verso le complicanze della cirrosi [91].

L'andamento della malattia anti-HBe positiva è variabile, e, in base alle fluttuazioni delle transaminasi e della replicazione virale, viene distinto in tre profili principali caratterizzati da:

- periodiche esacerbazioni necrotiche alternate a fasi di remissione biochimica con completa normalizzazione della citolisi epatica in cui i valori di HBV-DNA usualmente scendono sotto 5 log IU/mL
- periodiche esacerbazioni necrotiche senza fasi di remissione biochimica
- costante alterazione della citolisi

Il monitoraggio ravvicinato di questi pazienti ha dimostrato come le periodiche esacerbazioni necrotiche siano sempre precedute da un aumento dei livelli di replicazione virale e seguite da un rialzo dei livelli sierici di IgM anti-HBc, che costituiscono un marcatore surrogato di danno virus indotto [91]. Mentre le fluttuazioni della viremia ed i picchi citolitici possono essere eventi estremamente fugaci, gli anticorpi hanno una emivita più lunga e pertanto il riscontro di aumentati livelli di IgM anti-HBc in un soggetto con infezione da HBV in temporanea fase di remissione biochimica fa sospettare la presenza di un danno epatitico ricorrente [83]. Uno studio nel quale sono stati seguiti per un periodo medio di 6 anni 164 pazienti anti-HBe positivi (102 con quadro istologico basale di epatite cronica e 62 con cirrosi in stadio Child A), ha dimostrato che il 50% dei soggetti con epatite cronica al basale (età media 36 anni) ha sviluppato la cirrosi nel corso dell'osservazione, mentre solo l'8% dei pazienti ha avuto la risoluzione dell'epatite, conseguita in tutti i casi, tranne uno, grazie al trattamento con interferone [91]. I fattori associati ad un maggior rischio di progressione sono risultati essere:

- l'età,
- la presenza di steatosi,
- la tendenza ad avere viremia sempre dosabile con tecniche di ibridizzazione (superiore a 5 Log IU/mL),
- il profilo virologico associato alla persistente alterazione delle transaminasi con esacerbazioni intermittenti.

Il trattamento con interferone si è dimostrato in grado di rallentare la progressione di malattia anche nei pazienti con cirrosi, per cui nei trattati solo il 22.6% ha sviluppato complicanze nel corso del monitoraggio. Va comunque sottolineato che, complessivamente, solo il 13% dei pazienti trattati ha ottenuto una risposta virologica sostenuta con l'interferone. L'età e la presenza di fluttuazione delle IgM anti-HBc (condizione associata ai picchi necrotici intercorrenti, con o senza normalizzazione delle transaminasi) sono risultati fattori associati alla progressione della cirrosi [74]. E' interessante notare come la condizione che favorisce la progressione della malattia nella fase iniziale di epatite cronica è la presenza di florida replicazione virale associata a costante attività di malattia con

o senza i picchi necrotici ricorrenti, mentre quando è già instaurata la cirrosi sono gli episodi di esacerbazione che favoriscono lo sviluppo delle complicanze cliniche [74]. La spiegazione di ciò risiede nel fatto che per un paziente cirrotico una necrosi severa, come quella che si osserva nel profilo di malattia a picchi, può causare una grave compromissione funzionale con scompenso clinico e indurre un forte stimolo rigenerativo con promozione neoplastica.

La risoluzione spontanea del danno epatico con acquisizione di un efficace controllo immune dell'infezione è un evento assai infrequente nell'epatite cronica B anti-HBe positiva [74]. La mortalità a 5 anni dei pazienti con epatite cronica senza cirrosi è dello 0-2%, mentre sale al 14-20% nei soggetti con cirrosi compensata e al 70-80% nei cirrotici che hanno già avuto episodi di scompenso [90].

1.8 Diagnosi

La florida produzione di antigeni (HBsAg e HBeAg) da parte dell'HBV e la conseguente risposta anticorpale (anti-HBc, anti-HBs, anti-HBe) hanno favorito lo sviluppo di tecniche immunometriche che hanno permesso di affinare notevolmente la diagnostica dell'infezione e della malattia da HBV, molti anni prima che le metodiche di biologia molecolare entrassero nell'uso corrente del laboratorio di virologia clinica.

Dagli anni '80 in poi l'introduzione di metodiche per la determinazione dell'acido nucleico virale (HBV-DNA), con sensibilità sempre crescente, ha ulteriormente contribuito a migliorare la gestione del portatore di infezione da HBV [85]. Nello specifico, le metodiche suddette consentono di rispondere ai principali quesiti diagnostici:

- il soggetto è stato esposto al virus?
- il soggetto è immunizzato?
- il soggetto è infetto? Se sì, presenta replicazione virale e/o malattia epatica virus indotta?

La Tabella 3 permette di spiegare il significato dei principali marcatori diagnostici utilizzati per HBV.

<u>MARCATORI VIRALI</u>	<u>CATEGORIE DIAGNOSTICHE</u>
Anti-HBs	Immunità
Anti-HBc	Esposizione
HBsAg	Infezione
HBV-DNA, HBeAg	Infezione /Replicazione
IgM anti-HBc, HBV-DNA*	Malattia HBV-indotta

Tabella 3: Significato clinico dei markers sierologici di HBV

* Livelli di HBV-DNA >2.000 IU/mL nei soggetti HBeAg negativi e >20.000 IU/mL nei soggetti HBeAg positivi sono indicativi di epatite cronica B.

1.8.1 Diagnosi sierologica di primo livello

Un soggetto che presenta nel suo organismo il virus viene definito portatore dell'infezione da HBV. Il virus viene identificato mediante la dimostrazione della presenza dell'antigene di superficie (HBsAg) nel siero, o in caso di assenza di quest'ultimo, tramite la presenza del HBV-DNA nel siero o nel fegato. Nel primo caso si parla di infezione conclamata, nel secondo di occulta.

La diagnosi dell'**infezione conclamata** si basa sulla dimostrazione dell'HBsAg nel sangue. La determinazione degli antigeni è influenzata dall'affinità e dall'avidità di riconoscimento dell'anticorpo presente nel test. Bisogna tener conto della possibile presenza della mutazione G145R che renderebbe meno rilevabile HBsAg, quantomeno da parte di alcuni kit commerciali.

La diagnosi di **infezione occulta** si basa, invece, sulla dimostrazione di HBV-DNA nel sangue e/o nel fegato di soggetti HBsAg negativi. Questo tipo di infezione suscita interesse sia per quanto riguarda lo studio della biologia del virus che per le implicazioni cliniche, soprattutto per quello che concerne il rischio di riattivazione dell'epatite B in pazienti immunocompromessi, come quelli sottoposti a chemioterapia, e per il possibile ruolo di cofattore dell'HBV in pazienti con epatopatia cronica di altra eziologia.

Attualmente però le criticità che sussistono nella diagnosi di infezione occulta, in termini di assenza di protocolli e metodiche standardizzate, invasività del prelievo bioptico e possibili errori di campionamento non permettono di considerarla una pratica "routinaria". Pertanto, nella pratica clinica il medico deve ricordare che:

- i soggetti con positività dei marker di avvenuta esposizione ad HBV (anti-HBc positivi) hanno elevata probabilità di mantenere tracce del virus nel fegato;
- l'infezione da HBV è distinta in diverse fasi a seconda della presenza in circolo degli antigeni o degli omologhi anticorpi: HBsAg / anti-HBs, HBeAg / anti-HBe. Si deve però tener conto che immunocomplessi Ag-Ab possono essere presenti sia molto prima che dopo la siero conversione, quindi ne consegue che: bassi titoli di anti-HBs possono indicare sia la persistenza di una risposta anticorpale anni dopo l'esposizione primaria, andata in

risoluzione, che un'infezione cronica con bassa produzione antigenica, mentre alti titoli di anti-HBs ci indicano una risposta anticorpale spiccata in assenza di significativa produzione antigenica.

Per quanto riguarda l'anti-HBc, considerando il fatto che HBcAg non circola in forma libera nel sangue, abbiamo che :

- bassi titoli di anti-HBc indicano una minima o assente esposizione antigenica
- alti titoli di anti-HBc sono espressione di suggestiva e significativa stimolazione antigenica

Per tale ragione la presenza di titoli medio-alti (>1/100) di anti-HBc associato a negatività di anti-HBs può essere la spia di un'infezione occulta (Occult HBV Infection, OBI). Pertanto, in caso di immunosoppressione o chemioterapia, i soggetti con profilo sierologico di pregressa esposizione ad HBV devono essere monitorizzati per cogliere precocemente l'eventuale ricomparsa di infezione conclamata e/o sottoposti a profilassi antivirale.

Nel soggetto con infezione da HBV deve sempre essere esclusa la presenza dell'infezione da HDV con la ricerca degli anticorpi anti-HDV.

Riassumendo abbiamo (Tabella 4):

	Bassi titoli	Alti titoli
Anti-HBs	Persistenza Ab da esposizione pregressa andata in risoluzione oppure infezione cronica con bassa produzione antigenica	Risposta Ab spiccata senza significativa produzione residua
Anti-HBc	Minima/assente esposizione antigenica	Significativa stimolazione antigenica

Tabella 4: Interpretazione dei markers anticorpali

1.8.2 Diagnosi sierologica di secondo livello: caratterizzazione dell'infezione e identificazione del paziente con malattia epatica da HBV

La storia naturale dell'infezione e della malattia da HBV è influenzata dall'interazione tra virus e sistema immune dell'ospite, e in base ai diversi equilibri dinamici raggiunti, come già descritto precedentemente, si distinguono tre fasi principali, corrispondenti a specifici profili virologici e biochimici:

- **immuno-tolleranza:** caratterizzata da elevati livelli di HBsAg e HBV-DNA, in assenza di significativo danno epatico per l'assenza di risposta immune specifica [92] [93]; è usualmente associata ad HBeAg positività;
- **immuno-attivazione:** presenta riduzione dei livelli di HBsAg, fluttuazioni marcate della viremia e con diversi gradi di infiammazione epatica, conseguente all'attivazione del sistema immune; può essere associata sia ad HBeAg positività che ad anti-HBe positività;
- **immuno-controllo:** prevale la risposta immune competente ed efficace che determina riduzione del cccDNA intraepatico e/o il suo blocco funzionale con riduzione della replicazione virale e dell'HBsAg circolante senza l'induzione di un significativo danno epatico. E' sempre associata ad anti-HBe positività.

La caratterizzazione del profilo virologico nel portatore cronico di HBsAg è finalizzata a:

- definire la fase di infezione,
- stimare il rischio evolutivo in caso di epatite
- valutare la necessità o meno del trattamento antivirale

A tale scopo si determinano proteine (antigeni), acidi nucleici virali e la risposta immunologica umorale (anticorpi) del soggetto infettato; il pattern di tali marcatori risulta dall'equilibrio virus/ospite, varia nel corso dell'infezione e nel tempo nello stesso individuo. L'unico marcatore virale che descrive una caratteristica costitutiva del virus infettante è il genotipo.

L'HBV-DNA rappresenta l'unico marcatore di infezione e replicazione virale che indica anche la presenza di malattia epatica virus indotta. Secondo le

linee guida dell'AASLD e dell'EASL [94] il cut-off di 2000 IU/mL serve per distinguere:

- **infezione attiva:** quando >2000 IU/mL associa solitamente alla presenza di malattia epatica nel soggetto anti-HBe positivo o HBeAg positivo in fase di immuno-attivazione;
- **infezione inattiva:** quando persistentemente <2000 IU/mL associa alla assenza di malattia epatica nel soggetto anti-HBe positivo

Inizialmente il cut-off che distingue tra infezione attiva ed inattiva era stato posto a 20000 IU/mL. Tale limite, tuttavia, includeva una quota significativa di pazienti anti-HBe positivi con infezione attiva, il 40% dei quali presentava fluttuazioni importanti della viremia, che però solo occasionalmente potevano scendere <2000 IU/mL. Tuttavia, l'abbassamento della soglia a 2000 IU/mL classifica automaticamente come malati tutti i portatori con bassa replicazione virale (compresa tra 2000-20000 IU/mL), che generalmente non presentano un significativo danno epatico HBV-indotto.

Nel soggetto anti-HBe positivo l'accurata definizione dello stato replicativo si ottiene effettuando più misurazioni del valore dell'HBV-DNA durante un periodo di osservazione che deve essere almeno di 12 mesi con cadenza trimestrale. In questo modo è possibile scoprire eventuali risalite della viremia e identificare così il soggetto con vera infezione attiva.

Come ampiamente dimostrato in altri ambiti della medicina, l'uso complementare di più marcatori con diversi significati biologici permette un migliore inquadramento diagnostico. Nel caso specifico della gestione clinica del paziente con epatite da HBV in aggiunta all'HBV-DNA, negli ultimi anni, ha preso piede anche la quantizzazione dell'HBsAg circolante (**qHBsAg**), assumendo un ruolo rilevante nella definizione dello "stato di malattia" [95] [93]. Sappiamo, infatti, che i livelli circolanti di HBsAg variano in maniera significativa nelle varie fasi infettive: tendono a ridursi progressivamente dal periodo di immuno-tolleranza ($4.5-4.96 \log_{10}$ UI/mL) a quello di immuno-controllo/bassa replicazione virale ($2.86-3.09 \log_{10}$ IU/mL) [96] [97]; quanto più

sono bassi i valori di HBsAg tanto è maggiore il controllo immune dell'infezione [96] [93]. Infatti, uno studio condotto su più di 200 soggetti portatori di HBsAg, anti-HBe positivi, con infezione sostenuta dal genotipo D, ha dimostrato come bassi livelli di HBsAg (<1000 IU/mL) correlino con lo stato di inattività e che la misura combinata, in un singolo punto, di HBV-DNA e HBsAg, utilizzando un cut-off di 2000 IU/mL per l'HBV-DNA e di 1000 IU/mL per l'HBsAg, identifichi il portatore inattivo (*inactive carrier*, IC) con un'accuratezza diagnostica del 94.3% (sensibilità 91.1%, specificità 95.4%, VPP 87.9%, VPN 96.7%) [98]. Tali dati sono stati recentemente confermati su casistiche orientali in portatori infettati da genotipo B e C [99].

Gli anticorpi IgM anti-HBc sono il marker di danno HBV indotto universalmente utilizzato nella diagnostica dell'epatite acuta, mentre nella valutazione dell'infezione cronica è stato dimostrato come livelli di IgM anti-HBc >0,200 IMx index o >7 IU PEI correlino con la presenza di epatite cronica B [99].

Per l'inquadramento del portatore di infezione da HBV si effettua :

- ricerca di HBeAg e anti-HBe grazie alla quale possiamo distinguere in
 - o **HBeAg positivo** → portatore in fase di tolleranza o di attivazione
 - o **Anti-HBe positivo** → portatore in fase di attivazione o di controllo
- dosaggio quantitativo di HBV-DNA che nel caso di
 - o **portatore HBeAg positivo** non ci permette di distinguere se soggetto è in fase di tolleranza o di attivazione, anche se solitamente il soggetto tollerante presenta livelli viremici stabilmente elevati (>10⁸ IU/mL)
 - o **portatore anti-HBe positivo** con valori di viremia >20000 (IU/mL) si considera un paziente con epatite cronica B, mentre quando si hanno valori <20000 IU/ml necessitiamo di almeno 12-18 mesi di follow up trimestrale associato alla quantizzazione dell'HBsAg

- dosaggio quantitativo di HBsAg che nel caso di:
 - **portatore HBeAg positivo** livelli di HBsAg >50000 IU/mL identificano il portatore in fase di immuno-tolleranza se si associano a livelli viremici elevati (>10⁸ IU/mL), mentre nel paziente con epatite cronica i valori tendono a ridursi gradualmente stabilizzandosi su 25000-10000 IU/mL
 - **portatore anti-HBe positivo**, come accennato in precedenza, contribuisce significativamente alla diagnosi di portatore inattivo che di solito presenta livelli di HBsAg <1000 IU/mL, mentre nell'epatite cronica i valori tendono ad essere compresi tra 1000-9000 IU/mL [98].

A completamento diagnostico si può anche eseguire il dosaggio delle IgM anti-HBc (se eseguibile con metodiche di adeguata sensibilità analitica), che nel caso di :

- **portatore HBeAg positivo** permette di distinguere il soggetto
 - in fase di tolleranza con IgM anti-HBc negativo
 - in fase di attivazione (epatite cronica) con IgM anti-HBc positivo
- **portatore anti-HBe positivo** permette di distinguere il soggetto
 - in fase di attivazione (epatite cronica) con IgM anti-HBc positivo
 - portatore inattivo con IgM anti-HBc costantemente non dosabile

Riassumendo abbiamo (Tabella 5) :

	HBeAg positivo	Anti-HBe positivo
HBV-DNA (IU/mL)	Solitamente non ci permette di distinguere immunotollerante da epatite cronica, a meno che non sia $\geq 10^8$ → immunotollerante	<u>>20000</u> : epatite cronica B <u>< 20000</u> : follow-up trimestrale per 12-18 mesi in associazione a qHBsAg
qHBsAg (IU/mL)	<u>>50000</u> : immunotollerante <u>25000-10000</u> : epatite cronica B	<u>1000-9000</u> : epatite cronica B <u><1000</u> : portatore inattivo
IgM anti-HBc	<u>Negativo</u> : immunotollerante <u>Positivo</u> : epatite cronica B	<u>Positivo</u> : epatite cronica B <u>Negativo</u> : portatore inattivo

Tabella 5 : Interpretazione dei markers sierologici

1.9 Terapia

La terapia antivirale si incentra su una priorità assoluta, cioè il prevenire la progressione dell'epatite cronica verso un quadro fibrocicatrizzale cirrotico e della cirrosi (se già presente) verso le sue complicanze cliniche (ascite, encefalopatia epatica, rottura varici...), mediante il controllo dell'infezione e della replicazione virale.

Possiamo perseguire questo obiettivo grazie al raggiungimento di un nuovo equilibrio tra virus e sistema immunitario dell'ospite per l'acquisizione di una maggiore competenza da parte del sistema oppure una continua inibizione farmacologica della replicazione virale [94].

Per il trattamento dell'epatite B abbiamo attualmente a nostra disposizione 6 farmaci rimborsabili dal SSN e suddivisibili in 2 classi distinte:

- **interferone alfa ricombinante** (peg-IFN α 2a)
- **inibitori della polimerasi virale** : Lamivudina, Adefovir dipivoxil, Entecavir, Telbivudina, Tenofovir

Con i farmaci disponibili al momento abbiamo 2 tipi di approccio:

- **trattamento curativo** che ha come obiettivo quello di ottenere la guarigione tramite il raggiungimento di un controllo stabile dell'infezione tramite un ciclo a tempo determinato. Solitamente si effettua terapia con IFN, dotato sia di attività antivirale che immunomodulatrice [100] [101], che permette di modificare equilibrio a favore del sistema immune;
- **trattamento soppressivo** che mira a sopprimere il processo necroinfiammatorio bloccando la progressione della malattia; è attuabile con la somministrazione, a tempo indeterminato, con gli inibitori della polimerasi virale.

Il primo dei due ha una probabilità di successo che varia dal 15-35% e subisce l'influenza di fattori legati al tipo di epatite (minore nella forma HBeAg negativa rispetto alla HBeAg positiva) e allo schema terapeutico adottato [94].

Tra i pazienti che raggiungono una risposta virologica sostenuta (SVR), che possiamo definire come :

- raggiungimento della sieroconversione HBeAg→antiHBe,
- caduta dei livelli viremici <20000 IU/mL
- spegnimento del danno infiammatorio epatico

si osserva negli anni successivi al trattamento un elevato tasso di perdita dell'HBsAg con sieroconversione ad anti-HBs (compreso tra 40-80%) che è indicativo del raggiungimento di un estremamente elevato controllo dell'infezione [94].

L'efficacia del secondo approccio è influenzata dalla potenza del farmaco e dalla rapidità con cui viene sviluppata resistenza (con mutazioni geniche che selezionano varianti virali resistenti); per questi motivi il farmaco antivirale ideale sarebbe uno altamente potente e con elevata barriera genetica, che permette di "schivare" il meccanismo di resistenza [102]. Appartengono a questa categoria gli analoghi nucleos(t)idici di ultima generazione (Entecavir e tenofovir), che rappresentano il farmaco di scelta per il trattamento soppressivo [102].

Essendo stato ampiamente dimostrato che l'attivazione dei recettori toll-like (TLR) e la produzione dell'interferone (IFN) contribuiscono al controllo dell'infezione, recentemente sono stati presentati alcuni studi pre-clinici che dimostrerebbero la potenziale efficacia di farmaci agonisti per i recettori toll-like (TLR) nel trattamento dell'epatite cronica da HBV. Infine, con l'identificazione delle molecole effettrici attivate dalle vie di segnalazione di IFN e TLR, in particolare di quelle coinvolte nell'eliminazione/blocco trascrizionale del cccDNA, si potranno identificare nuovi target molecolari per lo sviluppo di farmaci anti-HBV [104].

2. SCOPO DEL LAVORO

Nelle ultime decadi a causa degli importanti cambiamenti epidemiologici che hanno interessato l'infezione cronica da HBV (netta riduzione, grazie ai programmi di vaccinazione, della trasmissione perinatale di HBV, causa principale della cronicizzazione dell'infezione, conseguente riduzione dei nuovi casi con aumento della prevalenza dei portatori anziani) i portatori cronici HBeAg negativi sono diventati prevalenti in molte aree geografiche, incluse Europa e Italia [104] [105] [106] [107].

Lo spettro delle possibili condizioni cliniche associate alla fase HBeAg negativa/anti-HBe positiva dell'infezione cronica da HBV è variabile: si va dallo stato di portatore con infezione inattiva (*inactive carrier*, IC) con livelli viremici persistentemente <2000 IU/mL e senza malattia di fegato attiva HBV-indotta, a quello di portatore cronico attivo con infezione attiva ed epatite (*Chronic Hepatitis B*, CHB) [108], nel quale i livelli viremici sono usualmente >20000 IU/mL. Un quadro intermedio, infine, è rappresentato da pazienti in cui si riscontrano livelli di viremia compresi tra 2000-20000 IU/mL; questa condizione di portatore attivo con bassa viremia (*Low Viremic-Active Carrier*, LV-AC), non è ancora chiaro se rappresenti una fase transitoria di bassa replica in un paziente con epatite cronica B oppure se sia una fase di passaggio verso una condizione di infezione inattiva [94].

In diversi studi, condotti prevalentemente in occidente, è stato dimostrato come la sopravvivenza dei portatori inattivi (IC) è paragonabile a quella della popolazione generale non infetta, almeno negli studi di coorte effettuati nei paesi occidentali [82], mentre, nei pazienti con epatite B (portatori attivi di infezione) il tasso di progressione annuale verso la cirrosi viene stimato tra 2,8% e 9,7% [69] [91] [109] [110] [111] [112]. I trattamenti antivirali attualmente disponibili spengono il danno epatico e riducono la tendenza evolutiva dell'epatite cronica a cirrosi, pertanto è fondamentale identificare correttamente i pazienti con epatite cronica (CHB) e trattarli precocemente o, comunque, prima dello sviluppo di un quadro cirrotico [113]. Tuttavia la diagnosi differenziale tra malato (CHB) e

portatore inattivo (IC) è talvolta problematica in particolare nel soggetto HBeAg negativo, poiché l'epatite cronica HBeAg negativa è spesso caratterizzata da fluttuazioni significative della viremia e delle transaminasi, con riduzioni intermittenti dei livelli di HBV-DNA anche <2000 IU/mL e normalizzazione prolungata dei valori di citolisi epatica [91][114][115]. Quindi al fine di garantire un'accurata diagnosi differenziale è necessario controllare i livelli di HBV-DNA e delle transaminasi per un periodo di almeno 12 mesi [104][115][116], con controlli almeno trimestrali. Il dosaggio quantitativo della viremia è indispensabile in quanto gli enzimi di citolisi non sono marcatori specifici di danno virus-indotto e le loro fluttuazioni possono essere causate anche da co-fattori di danno epatico non-virali [117].

I livelli di viremia ≤ 2000 IU/mL sono universalmente considerati dalle linee guida internazionali e nazionali [94] [119] come valore soglia per identificare la fase di infezione inattiva nel portatore HBeAg negativo. Tale soglia è stata identificata grazie ad uno studio di coorte condotto su un'ampia popolazione orientale seguita prospetticamente per oltre 10 anni: il livello di viremia osservato al basale fu messo in correlazione con gli esiti clinici nel tempo, il limite principale del lavoro è dovuto alla singola misurazione della viremia, che come abbiamo visto è invece soggetta, almeno in un sottogruppo di pazienti ad ampie fluttuazioni.

In effetti, in letteratura, sono presenti studi che descrivono la riattivazione della replicazione e del danno epatico in soggetti inizialmente classificati come portatori inattivi [118][120][121]. Tuttavia l'incidenza di tali riattivazioni risulta essere piuttosto variabile nelle casistiche esaminate (0-23%) [122][123][124][125] [126].

Lo scopo del lavoro è stato quello di studiare la storia naturale dell'infezione da HBV in una coorte di 153 portatori cronici, HBeAg negativi, con viremia ≤ 20000 IU/mL e transaminasi nella norma alla prima osservazione e seguiti prospetticamente. Sono stati valutati l'andamento virologico e clinico nel lungo termine, per identificare i fattori associati alla transizione:

- da infezione conclamata ad occulta (perdita dell'HBsAg sierico con o senza sviluppo di anti-HBs),
- da infezione attiva a bassa replica (viremia sempre ≤ 20000 IU/mL) ad inattiva (viremia sempre ≤ 2000 IU/mL)
- infezione inattiva ad attiva (riattivazione).

3. PAZIENTI E METODI

3.1 Casistica

Nel periodo compreso tra Gennaio 2000 e giugno 2011 presso l'Unità Operativa di Epatologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana sono stati valutati 257 portatori cronici di HBV, HBeAg negativi/anti-HBe positivi, con livelli viremici ≤ 20000 IU/mL, transaminasi nei limiti di norma (< 40 U/L), senza marcatori di avvenuta esposizione ad HDV, HCV e HIV o altri co-fattori di danno epatico (positività per autoanticorpi o introduzione etanolica > 20 g/die). Di essi, 153 (59.5%) sono stati arruolati nello studio, mentre i restanti 104 portatori non lo sono stati in quanto: 31 soggetti non hanno potuto garantire il monitoraggio per difficoltà logistiche (residenti fuori regione); 70 non hanno rispettato la schedula di monitoraggio per essere inclusi nello studio; 3 pazienti hanno iniziato una terapia antivirale profilattica per concomitante problematica onco-ematologica. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Ospedaliero e ciascun paziente prima di iniziare qualsiasi procedura diagnostica ha firmato un consenso informato.

Per tutti i soggetti al basale sono stati raccolti i dati demografici (età, sesso, paese di origine); virologici (HBV-DNA e HBsAg quantitativi genotipo); biochimici (transaminasi, indici di funzionalità epatica); strumentali (elastografia epatica (FibroScan), disponibile presso l'UO Epatologia dall'aprile 2004, nei pazienti seguiti dal 2001 è stata considerata come basale la prima indagine disponibile da quella data, ed ecografia addominale).

I parametri virologici (HBV-DNA) e biochimici (AST, ALT, GGT e APh) sono stati controllati ogni 3 mesi nel primo anno, ogni 3/6 mesi successivamente. L'HBsAg quantitativo, la funzionalità epatica, l'elastometria e l'ecografia epato-pancreatica sono state effettuate annualmente.

Alla fine del primo anno di monitoraggio i soggetti sono stati classificati come:

- **Portatori inattivi** (*Inactive Carrier, IC*) in caso di livelli sierici di HBV-DNA persistentemente <2000 IU/mL e ALT costantemente normali (<40 U/L);
- **Portatori attivi con bassi livelli viremici** (*Low viremic - Active Carriers, LV-AC*) se livelli sierici di HBV-DNA compresi tra 2000-20000 IU/mL con transaminasi normali (<40 U/L);
- **Portatore attivo di epatite cronica da HBV** (*Chronic Hepatitis B, CHB*) se HBV-DNA >20000 IU/mL e ALT fuori dal range normale (>40 U/L).

3.2 Test sierologici

I livelli sierici delle transaminasi (AST/ALT), degli indici di colestasi (GGT e fosfatasi alcalina), dei marcatori di funzionalità epatica (albumina, bilirubina totale e frazionata, tempo di protrombina, pseudocolinesterasi) sono state misurati su campioni freschi tramite procedure routinarie del laboratorio di biochimica dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana. La determinazione di HBsAg e HBeAg e anticorpi nei confronti di HBsAg (anti-HBs), di HBcAg (anti-HBc), di HBeAg (anti-HBe), di HDAg, HCV e HIV è stata effettuata mediante metodiche immunometriche commerciali (Abbott Laboratories, N. Chicago, IL, USA) presso il Laboratorio Trapianti dell'AOUP (Dr. Precisi).

La determinazione quantitativa dell'HBV-DNA è stata effettuata con il sistema COBAS Amplicor Monitor 2.0 HBV assay (Roche Diagnostic Systems Inc, Mannheim, Germany) con un limite inferiore di sensibilità di 200 copie/mL e un range di linearità compreso tra 200 e 20000 copie/mL (fattore di conversione, 5,82 copies = 1 IU) fino al 2005 e poi col sistema COBAS TaqMan assay, con una sensibilità di 12 IU/mL, e un range dinamico di $6-1.10 \times 10^8$ IU/mL. La genotipizzazione HBV è stata eseguita tramite sequenziamento diretto della regione HBs codificante per l'antigene S "small" presso il laboratorio di Fisiopatologia Epatica e Digestiva dell'UO Epatologia .

HBsAg è stato quantificato, presso il laboratorio di Fisiopatologia Epatica e Digestiva dell'UO Epatologia, utilizzando il sistema Architect HBsAg assay (Abbott Laboratories, N. Chicago, IL, USA; con un range dinamico di 0.05–250.0 IU/mL) dopo diluizione 1:100. I campioni con livelli di HBsAg >250.0 IU/mL alla diluizione 1:100 sono stati ritestati con la diluizione 1:1000, mentre i campioni con livelli di HBsAg <0.05 IU/mL alla diluizione 1:100 sono stati ritestati non diluiti.

3.3 Analisi statistica

I valori numerici sono stati espressi come valori mediani e range. I valori di HBsAg e HBV-DNA sono stati riportati in formato logaritmico.

Le differenze tra i sottogruppi sono state analizzate usando il **Chi-square test** per le variabili categoriche e l'**U-test di Mann-Whitney** o il **Test di Kruskal-Wallis** per le variabili continue. Sono stati considerati significativi i valori di $P < .05$.

Per identificare i fattori indipendentemente associati alla perdita dell'HBsAg nell'ambito dei portatori inattivi (IC), le variabili risultate significativamente associate alla perdita dell'HBsAg all'analisi univariata e quelle con trend di significatività ($P < .20$) sono state considerate nell'analisi multivariata (**regressione logistica binaria**). Lo stesso criterio è stato utilizzato per l'analisi multivariata mirata alla identificazione dei fattori indipendentemente associati:

- alla presenza di livelli basali di HBsAg >1000 IU/mL nei portatori inattivi (IC),
- alla transizione dalla condizione di portatori attivi a bassa replica virale (LV-AC) a quella di portatori inattivi (IC).

L'elaborazione dei dati e l'analisi statistica sono state effettuate utilizzando i seguenti software: **Microsoft Excel** (versione 2003, Microsoft Corporation, Redmond WA, USA) e **SPSS** (versione 20, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche della casistica alla prima osservazione

Nello studio sono stati seguiti prospetticamente 153 portatori HBsAg positivi/HBeAg negativi/anti-HBe positivi, che alla prima osservazione presentavano livelli di HBV-DNA ≤ 20000 IU/mL e transaminasi nei limiti di norma (Tabella n.1): l'età mediana era di 45.2 anni (20.5-79.2) e il 32.0 % aveva un'età ≤ 40 anni; 92 (60.1%) erano di sesso maschile. Centoventidue (79.7%) portatori erano di origine italiana, mentre dei 31 stranieri, 25 (16.4%) provenivano dall'Europa Orientale e 6 (3.9%) dall'Africa Sub-Sahariana. Alla prima osservazione i valori medi delle transaminasi e dell'HBV-DNA erano rispettivamente 22.0 U/L (10-40) e 2.70 \log_{10} IU/mL (0.70-4.29). L'identificazione del genotipo è stata possibile in 147 (96.1%) casi, nei restanti 6 (4.1%) la mancata amplificazione dell'HBV-DNA non l'ha resa eseguibile: l'infezione sostenuta da genotipo D è risultata essere la prevalente (129/147, 87.7%), mentre l'infezione da genotipo A era presente in 13 (8.8%) soggetti, da genotipo B in 1 (0.7%) caso, da genotipo E in 3 (2%) e da genotipo F in 1 (0.7%) .

Sesso	Età (Anni)	Età (Anni)	Origine	ALT (U/L)	Genotipo	HBV-DNA (\log_{10} IU/mL)	HBV-DNA (IU/mL)	HBsAg BL (\log_{10} IU/mL)	HBsAg BL (IU/mL)
Maschio	Mediana (Range)	≤ 40	Italiana	Mediana (Range)	D	Mediana (Range)	$\leq 200/201-1999/>2000$	Mediana (Range)	≤ 1000
92 (60.1%)	45.2 (20.5-79.2)	49 (32.0%)	122 (79.7%)	22.0 (10-40)	129 (87.7%) *	2.70 (0.70-4.29)	53/60/40	2.90 (-1.90-4.33)	86 (56.2%)

* non sono stati inclusi i 6 soggetti di cui non è stato identificato genotipo per mancata amplificazione dell'HBV-DNA

Tabella n.1: caratteristiche demografiche, biochimiche e virologiche al basale dei portatori cronici di HBV arruolati nello studio

4.2 Caratterizzazione dei portatori dopo 12 mesi di monitoraggio

Al termine dei primi 12 mesi di monitoraggio 87 (56.9%) portatori hanno mantenuto viremia costantemente ≤ 2000 IU/mL e sono stati classificati come portatori di infezione inattiva (portatori inattivi, IC), 46 (30.0%) viremia > 2000 IU/mL ma ≤ 20000 IU/mL e sono stati definiti come portatori attivi a bassa replicazione (LV-AC), in entrambi i gruppi le transaminasi si sono mantenute nella norma. I restanti 20 (13.1%) portatori hanno presentato un incremento dei livelli viremici oltre 20000 IU/mL, associato a rialzo delle transaminasi e sono stati inquadrati come portatori di infezione attiva con epatite cronica B (CHB). Al basale 113 portatori avevano livelli di HBV-DNA ≤ 2000 IU/mL: 4 (3.5%) hanno presentato un rialzo della viremia con alterazione delle transaminasi. L'evento è stato osservato esclusivamente nei portatori che avevano livelli di HBsAg > 1000 IU/mL: 4/42 (9.5%) vs 0/71, $P=0.008$. La contemporanea presenza al basale di HBV-DNA ≤ 2000 IU/mL e HBsAg ≤ 1000 IU/mL ha dimostrato un valore predittivo negativo (PPN) del 100% nell'identificare la riattivazione epatitica. I restanti 40 portatori presentavano al basale livelli viremici compresi fra 2000 e 20000 IU/mL: 16 (40.0%) hanno manifestato un quadro di riattivazione di epatite: 7 (46.7%) presentavano livelli di HBsAg ≤ 1000 IU/mL e 9 (36.0%) > 1000 IU/mL ($P=0.505$) (Figura n.1).

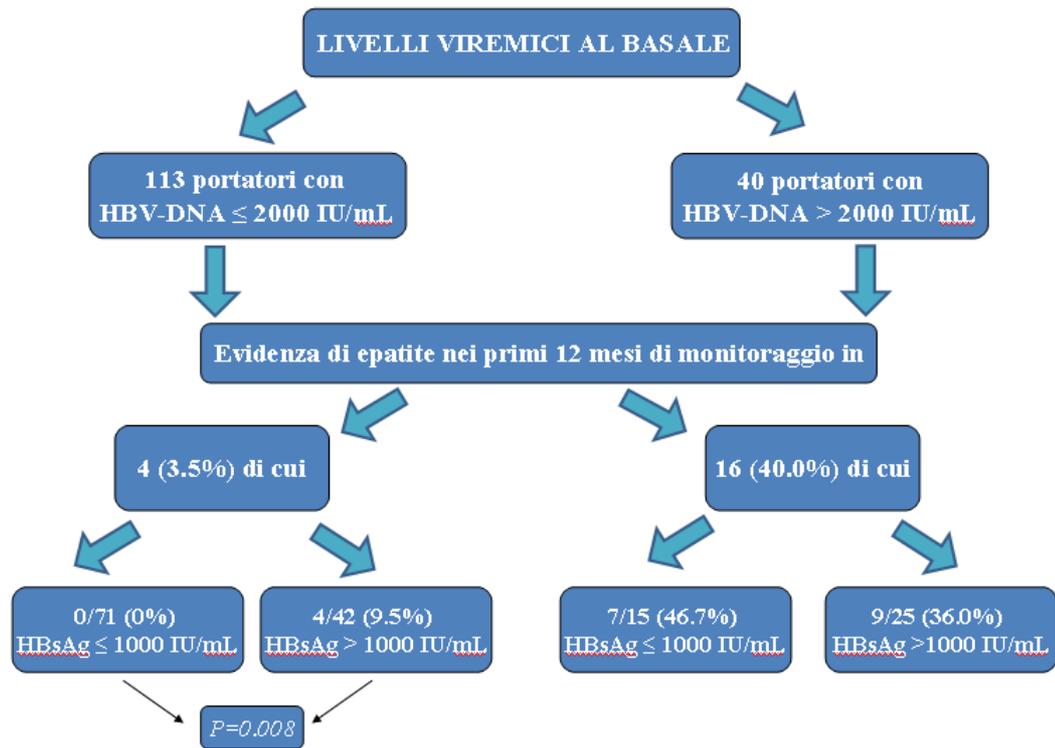


Figura 1: livelli viremici e dell'HBsAg al basale in accordo con l'evidenza di epatite nel 1° anno di osservazione

Le caratteristiche demografiche, biochimiche e virologiche al basale dei 3 gruppi di portatori di infezione cronica da HBV, definiti al termine dei primi 12 mesi di follow-up, sono descritte nella Tabella n.2:

Variabili	Sesso	Età (Anni)	Età (Anni)	Origine	ALT (U/L)	Genotipo	HBV-DNA (log10 IU/mL)	HBV-DNA (IU/mL)	HBsAg BL (log10 IU/ml)	HBsAg BL (IU/mL)
Fase della infezione	Maschio	Mediana (Range)	≤40	Italiana	Mediana (Range)	D	Mediana (Range)	≤200/200-1999/>2000	Mediana (Range)	≤1000 IU/ml
IC 87	49 (56.3%)	48.0 (22.3-76.0)	24 (27.6%)	72 (82.8%)	22.0 (10-40)	74 (89.2%)	2.13 (0.70-3.26)	47/40/0	2.61 (-1.40-4.13)	60 (69.0%)
LV-AC 46	27 (58.7%)	42.5 (20.8-79.2)	19 (41.3%)	34 (73.9%)	22.0 (10-40)	38 (86.0%)	3.36 (1.23-4.28)	5/17/24	3.12 (-0.46-4.03)	19 (41.3%)
CHB 20	16 (80.0%)	44.3 (20.5-51.1)	7 (35.0%)	16 (80.0%)	29.0 (16-165)	17 (85.0%)	3.80 (2.27-4.29)	1/3/16	3.40 (1.78-4.33)	7 (35.0%)
P value	0.145	0.027	0.268	0.482	0.025	0.830	<0.001	<0.001	<0.001	0.001

Tabella n.2: caratteristiche demografiche, biochimiche e virologiche al basale dei portatori in base alla classificazione fatta dopo 12 mesi di monitoraggio

I portatori inattivi sono risultati essere significativamente più anziani rispetto ai portatori di infezione attiva con bassi livelli viremici e ai pazienti con epatite cronica [48.0 (22.3-76.0) vs. 42.5 (20.8-79.2) vs. 44.3 (20.5-51.1) anni; $P=0.027$]. Al contrario sesso ed origine etnica non hanno dimostrato differenze statisticamente significative fra i 3 gruppi. Nonostante al basale i valori delle transaminasi fossero nei limiti di normalità in tutti i portatori, nei pazienti con successiva evidenza di epatite cronica sono risultati essere comunque più elevati rispetto ai LV-AC e IC [29.0 (16-165) vs. 22.0 (10-40) vs. 22.0 (10-40) U/L; $P=0.025$]. La distribuzione dei diversi genotipi è risultata essere omogenea nei 3 gruppi di portatori, mentre i livelli di HBV-DNA [2.13 (0.70-3.26) vs. 3.36 (1.23-4.28) vs. 3.80 (2.27-4.29) log₁₀ IU/mL; $P<0.001$], di HBsAg [2.61 (-1.40-4.13) vs. 3.12 (-0.46-4.03) vs. 3.40 (1.78-4.33) log₁₀ IU/mL; $P<0.001$] sono risultati essere inferiori nei portatori inattivi rispetto ai LV-AC e ai pazienti con CHB, che presentavano valori fra loro comparabili. Per quanto riguarda l'HBsAg, il 69.0% degli IC (60/87) presentava livelli ≤ 1000 IU/mL rispetto al 41.3% (19/46) e al 35.0% (7/21) dei LV-AC e dei pazienti con epatite cronica ($P=0.001$).

4.3 Monitoraggio a lungo termine dei portatori inattivi (IC) e attivi con bassa replicazione (LV-AC)

I portatori con livelli viremici sempre ≤ 20000 IU/mL e transaminasi nella norma (IC e LV-AC) durante il primo anno di follow-up, sono stati seguiti con controlli almeno semestrali per ulteriori 57.2 mesi (8.5-158.3).

A fine follow-up, 19 degli 87 (21.8%) IC hanno perso l'HBsAg, 65 (74.7%) hanno mantenuto un quadro virologico stabile, mentre 3 (3.4%) hanno mostrato aumenti dell'HBV-DNA al di sopra di 2000 IU/mL. Tali incrementi sono stati transitori e non hanno mai superato le 10000 IU/mL (4950, 5800, 8000 IU/mL rispettivamente), né si sono associati ad alterazione delle transaminasi (Figura 2). Per quanto riguarda i 46 LV-AC, 20 (43.5%) hanno avuto una transizione nella fase di infezione inattiva e 2 di essi (2/20, 10.0%) hanno perso l'HBsAg, 25 (54.3%) LV-AC hanno mantenuto una condizione virologica stabile, con HBV-DNA compreso tra 2000-20000 IU/mL e transaminasi nella norma; un (2.2%) soggetto ha presentato una risalita dei livelli viremici oltre 20000 IU/mL e alterazione delle transaminasi (Figura n.2).

Dal punto di vista clinico e strumentale, durante il periodo di monitoraggio, non vi è stata evidenza di progressione del danno epatico: il quadro ecografico è rimasto stabile e i valori elastometrici non si sono modificati [IC e LV-AC: al basale 4.9 (2.7-5.8) e 4.6 (2.5-6.2) kPa vs 5.2 (3.1-6.1) e 4.6 (3.2-5.9) kPa a fine follow-up].

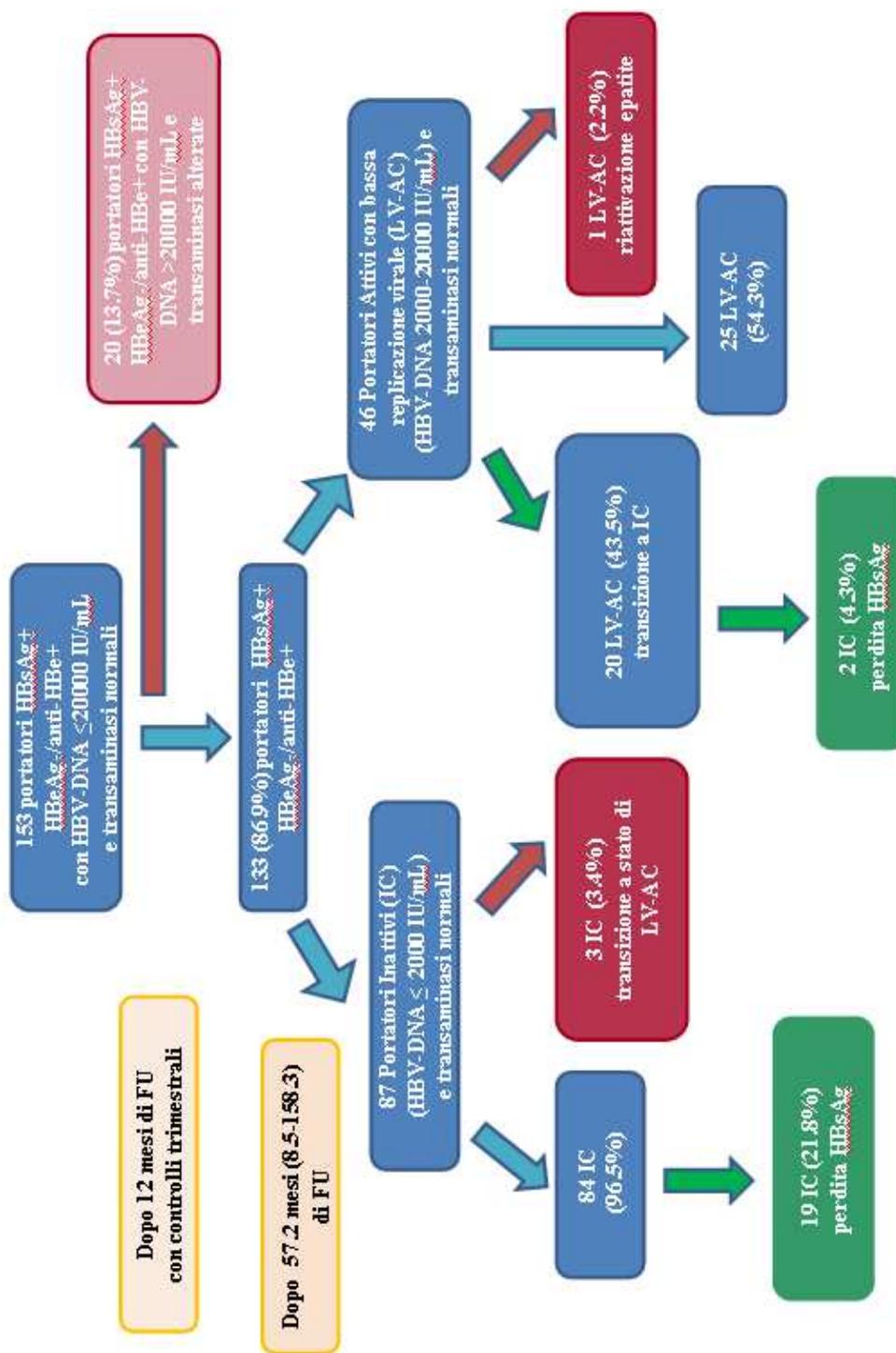


Figura n.2: Andamento virologico e biochimico durante il monitoraggio

4.3.1 Variazione dei livelli di HBsAg durante il monitoraggio

Durante il follow-up i livelli di HBsAg si sono ridotti sia nei portatori inattivi [BL 2.61 (-1.40-4.13) log₁₀ IU/mL vs. EOF 2.03 (-1.40-4.22) log₁₀ IU/mL] che negli Attivi con bassa replica [BL 3.12 (-0.46-4.03) log₁₀ IU/mL vs. EOF 2.97 (-1.40-4.32) log₁₀ IU/mL]: sia la variazione complessiva (Delta variazione) [0.17 (-1.07-3.54) vs 0.15 (-0.32-4.53) log IU/mL; $P=0.363$] che la riduzione annuale dell'HBsAg [0.03 (-0.30-1.33) vs 0.02 (-0.10-0.60) log IU/mL; $P=0.255$], non sono risultate significativamente diverse nei due gruppi (Tabella n.3).

Variabili	HBsAg BL (log ₁₀ IU/mL)	HBsAg EOF (log ₁₀ IU/mL)	HBsAg Delta Variazione (log ₁₀ IU/mL)	HBsAg Delta Variazione annuale (log ₁₀ IU/mL)	Follow-Up (Mesi)
Fase della infezione	Mediana (Range)	Mediana (Range)	Mediana (Range)	Mediana (Range)	Mediana (Range)
IC 87	2.61 (-1.40-4.13)	2.03 (-1.40-4.22)	0.17 (-1.07-3.54)	0.03 (-0.30-1.33)	67.9 (20.5-170.1)
LV-AC 45	3.12 (-0.46-4.03)	2.97 (-1.40-4.32)	0.15 (-0.32-4.53)	0.02 (-0.10-0.60)	71.7 (30.4-170.3)
P value	<0.001	<0.001	0.363	0.255	0.646

Tabella n.3 Livelli di HBsAg al basale e durante il monitoraggio

nei Portatori Inattivi e Attivi con bassi livelli replicativi

4.3.2 Fattori associati ai diversi esiti virologici nei Portatori

Inattivi

Nel corso del follow-up 19 (21.8%) degli 87 IC hanno perso l'HBsAg circolante con sviluppo di anti-HBs in 10 (52.7%) e 3 (3.4%) portatori hanno avuto una risalita dei livelli di HBV-DNA oltre 2000 IU/mL. All'analisi univariata la perdita dell'HBsAg è risultata essere associata a più bassi livelli basali di HBV-DNA [1.23 (0.70-2.60) vs 2.36 (0.70-3.26) log₁₀ IU/mL; $P<0.001$] e di HBsAg [0.76 (-1.40-2.14) vs 2.36 (0.70-3.26) log₁₀ IU/mL; $P<0.001$]. Inoltre, i portatori che hanno perso l'HBsAg hanno dimostrato una più significativa variazione annuale dei livelli di HBsAg [0.22 (0-1.33) vs 0.02 (-0.30-0.76) log₁₀ IU/mL; $P<0.001$]. Al contrario, sesso, età, paese di origine, livelli di transaminasi al basale e genotipo infettante non hanno presentato differenze statisticamente significative. All'analisi multivariata, oltre ai livelli basali di HBsAg e alla loro variazione annuale ($P=0.009$ e $P=0.010$) anche il follow-up totale ($P=0.031$) è risultato essere indipendentemente associato alla perdita dell'HBsAg (Tabella n.4).

Variabili		Perdita di HBsAg (19pz)	Mantenimento HBsAg (68pz)	Analisi Univariata	Analisi Multivariata			
Categorie/Unità				P	Odd Ratio	95% Intervallo di Confidenza		P
Sesso	Maschio	14 (73.7%)	35 (51.5%)	0.143	0.986	0.285	3.411	0.982
Età	Anni	49.0 (30.1-60.1)	47.3 (22.3-76.0)	0.914				
Origine	Italiana	17 (89.5%)	55 (80.9%)	0.594				
ALT Basale	U/L	22.0 (12-72)	21.5 (10-122)	0.934				
Follow-Up #	Mesi	87.7 (26.5-170.1)	65.9 (20.5-156.0)	0.086	1.073	1.006	1.144	0.031
Genotipo *	D	15/16 (93.8%)	59/67 (88.1%)	0.833				
HBV-DNA Basale	log ₁₀ IU/mL	1.23 (0.70-2.60)	2.36 (0.70-3.26)	<0.001	0.739	0.106	5.171	0.761
HBsAg Basale	log ₁₀ IU/mL	0.76 (-1.40-2.14)	2.82 (0.30-4.13)	<0.001	0.028	0.002	0.404	0.009
HBsAg Delta Variazione	log ₁₀ IU/mL	2.16 (0-3.54)	0.08 (-1.07-1.86)	<0.001				
HBsAg Delta Variazione Annuale	log ₁₀ IU/mL per anno	0.22 (0-1.33)	0.02 (-0.30-0.76)	<0.001	1.52E ⁷	53.537	4.35E ¹²	0.010

follow-up complessivo

* il genotipo è stato caratterizzabile in 83 degli 87 pazienti classificati come portatori inattivi (IC)

Tabella n.4: Analisi uni e multivariata relativamente ai fattori associati

alla perdita dell'HBsAg serico nei portatori inattivi

Tutti e 3 i portatori inattivi che hanno avuto fluttuazioni della viremia oltre 2000 IU/mL avevano un'infezione sostenuta da genotipo D; 2, di origine albanese, avevano meno di 30 anni (22 e 26 rispettivamente) e nel corso del follow-up hanno dimostrato una progressiva riduzione dei livelli di HBsAg (BL 5873 e 1863 IU/mL vs EOF 2840 e 1547 IU/mL), mentre la viremia, che ha raggiunto valori massimi di 4950 e 5800 IU/mL, a fine osservazione era di 599 e 33 IU/mL. L'altro portatore era di origine italiana, aveva 59 anni e ha dimostrato una tendenza all'incremento dei livelli di HBsAg durante il periodo di osservazione (BL 5910 vs EOF 7226 IU/mL) nonostante i livelli di HBV-DNA dopo il picco di 8000 IU/mL si siano ridotti a 788 IU/mL a fine follow-up. In nessuno dei 3 casi si è osservata alterazioni delle transaminasi.

4.3.3 Fattori associati a livelli di HBsAg >1000 IU/mL nei

Portatori Inattivi

Nell'attuale casistica il 31.0% dei portatori inattivi presentava al basale livelli di HBsAg maggiori di 1000 IU/mL; i fattori associati a tale condizione all'analisi univariata sono risultati essere l'età ≤ 40 anni, il genotipo diverso dal D e l'origine non italiana (rispettivamente con $P=0.009$, $P=0.041$, and $P=0.003$); all'analisi multivariata hanno mantenuto la significatività l'origine ($P=0.049$) e il genotipo ($P=0.038$) (Tabella n.5).

Variabili		HBsAg Basale		Analisi Univariata	Analisi Multivariata			
Categorie/Unità		≤ 1000	> 1000	P	Odd Ratio	95% Intervallo di Confidenza		P
Sesso	Maschio	36 (73.5%)	13 (26.5%)	0.425				
	Femmina	24 (63.2%)	14 (36.8%)					
Età	≤ 40 anni	11 (45.8%)	13 (54.2%)	0.009	0.702	0.388	1.271	0.243
	> 40 anni	49 (77.8%)	14 (22.2%)					
Origine	Italiana	55 (76.4%)	17 (23.6%)	0.003	2.007	1.003	4.015	0.049
	Non Italiana	5 (33.3%)	10 (66.7%)					
Genotipo	Genotipo D	54 (73.0%)	20 (27.0%)	0.041	0.439	0.202	0.954	0.038
	Genotipo non D	3 (33.3%)	6 (66.7%)					

Tabella n.5: Analisi uni e multivariata relativa ai fattori associati alla presenza di livelli di HBsAg > 1000 IU/ml nei portatori inattivi

4.3.4 Fattori associati ai diversi esiti virologici nei Portatori Attivi con bassa viremia

Durante il follow-up il 43.5% (20/46) dei LV-AC ha presentato una transizione alla fase di Infezione Inattiva, mentre 1 soggetto (2.2%) ha avuto un incremento dei livelli viremici oltre 20000 IU/ml associato ad alterazione delle transaminasi, manifestando quindi un quadro di epatite cronica B.

La transizione alla fase di infezione inattiva si è associata, all'analisi univariata, alla presenza di più bassi livelli di HBsAg al basale [3.13 (0.46-4.01) vs 3.45 (2.52-4.03) log₁₀ IU/mL; $P=0.008$]. In particolare nei soggetti con livelli basali di HBsAg ≤ 2000 IU/mL si è osservata una più elevata frequenza di transizione verso la condizione di portatore inattivo [18/20 (90.0%) vs 8/26 (30.8%); $P<0.001$]. All'analisi multivariata i livelli basali di HBsAg ≤ 2000 IU/mL ($P=0.003$) sono rimasti indipendentemente associati al raggiungimento di un più efficace controllo dell'infezione (Tabella n.6).

Variabili		Transizione da LV-AC a IC		Analisi Univariata	Analisi Multivariata			
Categorie/Unità		Si 20	No 26	P	Odd Ratio	95% Intervallo di Confidenza		P
Sesso	Maschio	14 (70.0%)	13 (50.0%)	0.287				
Età	Anni	43.1 (26.6-64.1)	36.9 (20.8-79.2)	0.041	0.986	0.925	1.050	0.659
Età	≤ 40	4 (20.0%)	15 (57.7%)	0.023				
Origine	Italiana	17 (85.0%)	17 (65.4%)	0.245				
ALT Basale	U/L	22.0 (14-37)	22.0 (10-56)	1				
Follow-Up	Mesi	73.7 (32.2-147.8)	63.5 (30.4-170.3)	0.557				
Genotipo	D	18 (90.0%)	20 (83.3%)	0.841				
HBV-DNA Basale	log ₁₀ IU/mL	3.41 (1.23-4.12)	3.46 (1.23-4.28)	0.499				
HBV-DNA	≤ 200 IU/mL	2 (10.0%)	3 (11.5%)	0.265				
HBV-DNA	200-2000 IU/ml	10 (50.0%)	7 (26.9%)	0.265				
HBV-DNA	2000-20,000 IU/mL	8 (40.0%)	16 (61.5%)	0.265				
HBsAg Basale	≤ 2000 IU/mL	18 (90.0%)	8 (30.8%)	<0.001	4.469	1.691	11.812	0.003
HBsAg Delta Variazione	log ₁₀ IU/mL	0.15 (-0.12-4.53)	0.08 (-0.32-0.78)	0.088				
HBsAg Delta Variazione annuale	log ₁₀ IU/mL	0.02 (-0.02-0.60)	0.01 (-0.10-0.20)	0.106	74.360	0.006	8.54 E ⁵	0.366

Tabella n.6: Analisi uni e multivariata relativa ai fattori associati con la transizione da infezione attiva a bassa replica a infezione inattiva

La transizione dallo stato di LV-AC ad una fase caratterizzata da più elevati livelli viremici e alterazione delle transaminasi è stata documentata in 1 caso, con infezione sostenuta da genotipo D, i livelli di HBV-DNA e HBsAg al basale erano rispettivamente di 3309 e 3955 IU/mL: la risalita dei livelli viremici oltre la soglia di 20000 IU/mL è avvenuta rispettivamente dopo 79 mesi e la viremia osservata era di 37587 IU/mL.

5. DISCUSSIONE

Nello studio il 13.1% (20/153) dei portatori cronici di HBV con livelli di HBV-DNA ≤ 20000 IU/mL e valori di transaminasi nei limiti di norma alla prima osservazione ha manifestato durante i primi 12 mesi di follow-up un quadro virologico e biochimico compatibile con epatite cronica B, mentre nei successivi 5 anni di monitoraggio solo lo 0.75% (1/133) dei soggetti che hanno mantenuto la viremia ≤ 20000 IU/mL per 1 anno ha sviluppato danno epatico attivo.

Nessun portatore che nel primo anno di monitoraggio ha mantenuto, a controlli trimestrali, un profilo di infezione inattiva (viremia sempre ≤ 2000 IU/mL e transaminasi nella norma) ha dimostrato successivamente evidenza di epatite cronica B. Al contrario il 3.5% (4/113) dei soggetti con viremia ≤ 2000 IU/mL alla prima osservazione ha manifestato nel primo anno di monitoraggio un cambiamento del profilo virologico con sviluppo di epatite: questo, però, non è successo ad alcuno dei 71 soggetti che oltre ai bassi livelli di viremia avevano, al basale, livelli di HBsAg ≤ 1000 IU/mL. Nel primo anno di osservazione, la ripresa di replicazione virale associata a danno epatico è comparsa molto più frequentemente nei portatori che al basale avevano livelli viremici fra 2000 e 20000 IU/mL (16/40, 40%, $P < 0.001$), indipendentemente dai livelli di HBsAg (36.0% e 46.7% per livelli di HBsAg > 0 o ≤ 1000 IU/mL rispettivamente; $P = 0.505$). Tuttavia, nei successivi 5 anni di follow-up, solo 1 dei 46 (2.2%) portatori che hanno mantenuto nei primi 12 mesi viremia compresa fra 2000 e 20000 IU/mL ha sviluppato un quadro di epatite.

I risultati dell'attuale studio prospettico, in accordo con le odierne linee guida, confermano la necessità di almeno 12 mesi di controlli trimestrali per giungere ad un affidabile inquadramento del portatore di HBsAg, HBeAg negativo/anti-HBe positivo giunto alla prima osservazione con bassi livelli viremici e transaminasi nella norma, quando per la definizione diagnostica vengano utilizzati esclusivamente i livelli della viremia e delle transaminasi [94]. Al contrario l'uso combinato della singola misura quantitativa dei livelli sierici al basale di HBV-

DNA e dell'HBsAg grazie all'elevato valore predittivo negativo (PPN 100%) permette di identificare il soggetto senza rischio di riattivazione epatitica.

Infatti, nella casistica oggetto dello studio, nessuno dei pazienti che ha manifestato un quadro di epatite presentava al basale livelli di HBsAg ≤ 1000 IU/mL e di HBV-DNA ≤ 2000 IU/mL, mentre il 9.5% dei soggetti con HBV-DNA ≤ 2000 IU/ml, ma HBsAg > 1000 IU/mL ($P=0.008$) ha sviluppato evidenza di epatite nel primo anno.

L'evidenza che il 95.2% (20/21) delle transizioni da fase a bassa replicazione al profilo di infezione attiva con epatite B sia avvenuta nel primo anno di monitoraggio suggerisce come questi pazienti si trovassero al momento della prima osservazione in una fase di temporanea remissione della loro epatite cronica HBeAg negativa, piuttosto che abbiano manifestato riattivazione epatitica partendo da una condizione di controllo immune dell'infezione [69][91]. Infatti, la temporanea remissione dell'epatite cronica B HBeAg negativa si osserva in circa il 20% dei pazienti e talora le remissioni spontanee possono durare anche parecchi mesi, mimando il profilo dell'infezione inattiva [91][98].

Lo studio dimostra come nei portatori che mantengono per un anno a controlli ravvicinati bassa replicazione (viremia ≤ 20000 IU/mL) la riattivazione epatitica sia un evento raro (1/133, 0.75% in 5 anni), che non si osserva mai nei portatori con infezione inattiva. Talora in questo gruppo di portatori si possono osservare delle fluttuazioni della viremia al di sopra di 2000 IU/mL, ma l'evento è infrequente (3 su 87 casi in 5 anni) e caratterizzato da livelli viremici bassi (valori fra 5000 e 8000 IU/mL), mentre le transaminasi non si alterano. E' interessante notare come in 2 dei 3 soggetti con incremento della viremia, questa, durante il successivo follow-up, si sia gradualmente ridotta assieme ai livelli di HBsAg, suggerendo un graduale potenziamento del controllo dell'infezione. Complessivamente, la persistenza della viremia ≤ 20000 IU/mL si associa, quindi, ad una condizione stabile dal punto di vista sia virologico che clinico, senza segni biochimici di danno epatico attivo ed evolutivo, come dimostrato anche dai valori dell'elastometria epatica, mantenutisi sempre nella norma e invariati nel tempo [valori di Elastometria degli IC e LV-AC: BL 4.9 (2.7-5.8) e 4.6 (2.5-6.2) kPa vs EOF 5.2 (3.1-6.1) e 4.6 (3.2-5.9) kPa].

Nell'ambito dei portatori che mantengono durante tutto il follow-up bassa viremia (HBV-DNA ≤ 20000 IU/mL), i portatori inattivi sono più anziani rispetto ai portatori attivi con bassa replicazione [48.0 (22.3-76.0) anni vs 42.5 (20.8-79.2) anni; $P=0.027$] e solo il 27.6% (24/87) di essi ha meno di 40 anni, rispetto al 41.3% (19/46) dei LV-AC. Inoltre gli IC al basale hanno livelli sierici di HBsAg significativamente più bassi [2.61 (-1.40-4.13) \log_{10} IU/mL vs 3.12 (-0.46-4.03) \log_{10} IU/mL; $P<0.001$] e il 69.0% ha livelli di HBsAg ≤ 1000 IU/mL, rispetto al 41.3% dei portatori con bassi viremici ($P=0.004$). Tuttavia nel corso del follow-up i livelli di HBsAg si riducono significativamente in entrambi i gruppi.

Considerando complessivamente i risultati del lavoro l'ipotesi più verosimile è che la condizione di infezione attiva a bassa replica (viremia >2000 IU/mL, ma persistentemente ≤ 20000 IU/mL) rappresenti una fase dell'infezione che prelude nella maggior parte dei soggetti al raggiungimento di un efficace controllo dell'infezione. In accordo è l'evidenza che il 43.5% (20/46) dei LV-AC nell'arco dei 5 anni di follow-up ha una transizione alla fase di infezione inattiva (riduzione e persistenza dei livelli di HBV-DNA <2000 IU/mL), con perdita dell'HBsAg in 2 (4.3%). Il controllo immune tende ulteriormente a consolidarsi nel tempo anche negli IC, come dimostrato dal fatto che, in 5 anni, 19 degli 87 portatori inattivi (21.8%) perde l'HBsAg sierico, con un tasso annuale di perdita dell'HBsAg del 4.6%, e in 10 (11.5%) si abbia la sieroconversione ad anti-HBs (Figura 3).

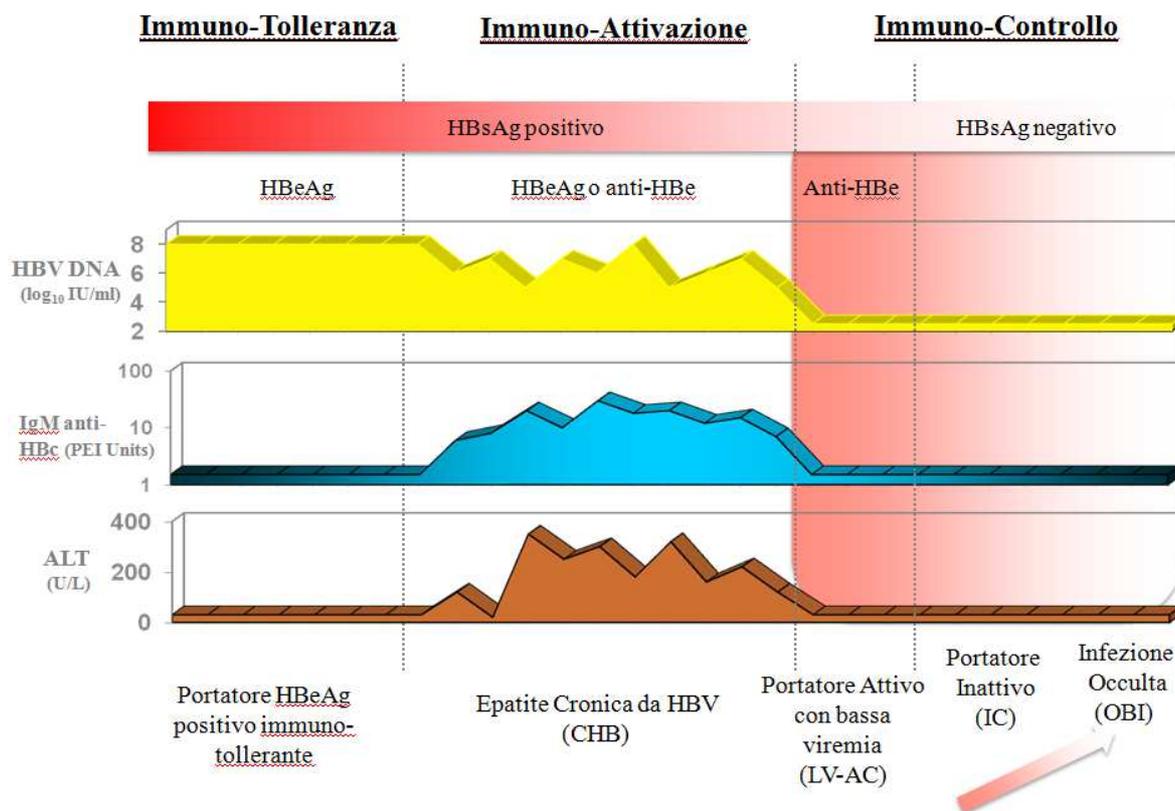


Figura 3: Storia naturale dell'infezione cronica da HBV

I nostri risultati confermano ulteriormente i dati di letteratura circa la correlazione inversa fra entità del controllo immune e livelli di HBsAg sierici [128]. Infatti, i livelli sierici basali dell'HBsAg ($P=0.009$), con la loro variazione annuale ($P=0.010$) e la durata complessiva del follow-up ($P=0.031$), sono risultati essere i parametri indipendentemente associati con la perdita dell'HBsAg nei portatori inattivi, e si sono dimostrati l'unico fattore correlato con la transizione alla fase di infezione inattiva nei soggetti con infezione attiva a bassa replicazione ($P=0.044$ e $P=0.002$ per livelli di HBsAg ≤ 2000 IU/mL). Quindi, proprio nella fase dell'infezione in cui il portatore raggiunge un efficace controllo immune i livelli sierici di HBsAg dimostrano la massima utilità prognostica e diagnostica in quanto contribuiscono ad una più puntuale caratterizzazione dell'infezione. In particolare, come precedentemente discusso la contemporanea presenza di livelli di HBV-DNA ≤ 2000 IU/mL e HBsAg ≤ 1000 IU/mL ha dimostrato un'elevata

specificità (83.3%) nell'identificare il portatore inattivo. Tuttavia, nell'attuale coorte di portatori inattivi la proporzione di pazienti con livelli di HBsAg >1000 IU/mL è risultata essere superiore (31% vs 9%) rispetto a quella osservata in un precedente studio condotto su 56 portatori inattivi tutti con infezione sostenuta da genotipo D [98]. L'analisi dei fattori associati con tale profilo virologico (infezione inattiva, ma livelli di HBsAg >1000 IU/mL) ha dimostrato all'univariata un'associazione con l'età ($P=0.009$), l'origine non italiana ($P=0.003$) e il genotipo non D ($P=0.041$), mentre gli ultimi 2 fattori si sono confermati significativi anche all'analisi multivariata ($P=0.049$ e $P=0.038$ rispettivamente). Il dato è in accordo con studi in vitro e in vivo che dimostrano come il genotipo rappresenti una variabile costitutiva virale che condiziona i livelli di HBsAg, indipendentemente dai livelli di controllo del sistema immune sull'infezione. Inoltre, l'associazione degli alti livelli di HBsAg anche con l'età più giovane e l'origine non italiana dei portatori inattivi fa ipotizzare che una più recente sierconversione HBeAg/anti-HBe e altri aspetti legati alla storia dell'infezione, che sappiamo essere influenzata anche da aspetti genetico-ambientali, possano avere un ruolo nel determinare tale condizione. In accordo con l'ipotesi sono i dati presenti letteratura che dimostrano una lenta cinetica della caduta dei livelli di HBsAg nei primi 8 anni dopo la sierconversione HBeAg/anti-HBe [127]. Questi dati confermano come nella pratica clinica la gestione del singolo paziente debba sempre integrare le informazioni clinico-demografiche e quelle virologiche per utilizzare in modo appropriato il dato di laboratorio.

6. CONCLUSIONI

Il nostro lavoro conferma la necessità di procedere ad una puntuale caratterizzazione virologica del portatore di HBsAg, HBeAg negativo/anti-HBe positivo che giunge alla prima osservazione con bassi livelli di replicazione (HBV-DNA ≤ 20000 IU/mL) e transaminasi nella norma, per il rischio di non diagnosticare una sottostante epatite cronica B in fase di remissione. Tuttavia l'accuratezza diagnostica può essere notevolmente migliorata grazie all'utilizzo combinato dei livelli di viremia e di HBsAg; con tale approccio è possibile giungere rapidamente e con una singola determinazione ad una puntuale identificazione del portatore inattivo. Tuttavia, in un portatore con profilo viremico da infezione inattiva, ma con elevati livelli di HBsAg occorre tener conto delle variabili legate alle caratteristiche intrinseche del virus (es. genotipo), dell'infezione o dell'ospite che possono giustificare elevati livelli dell'antigene anche in presenza di un efficace controllo dell'infezione.

I portatori di HBsAg che mantengono livelli viremici sempre ≤ 20000 IU/mL non presentano segni biochimici o strumentali di danno epatico HBV-indotto e hanno un rischio di riattivazione molto basso; nel caso in cui abbiano inizialmente viremia compresa fra 2000 e 20000 IU/mL hanno un'elevata probabilità di diventare portatori inattivi nel corso del successivo follow-up, mentre circa il 20% dei portativi inattivi al basale perderà in 5 anni l'HBsAg, transitando nella fase di infezione occulta.

7. RIASSUNTO

PREMESSA: La maggioranza dei portatori di infezione cronica da HBV presenti attualmente nella nostra area presenta un profilo virologico caratterizzato dalla negatività dell'antigene "e" (HBeAg) e dalla positività dell'anticorpo omologo (anti-HBe). I portatori HBeAg negativi possono presentare differenti quadri clinici, dall'epatite cronica (*chronic hepatitis B*, CHB, con HBV-DNA >20000 IU/mL e transaminasi alterate), allo stato di portatore inattivo (*inactive carrier*, IC, con HBV-DNA persistentemente ≤ 2000 IU/mL e transaminasi normali); alcuni soggetti, infine, definiti portatori attivi a bassa replica (*low viremic active carrier*, LV-AC) presentano una condizione intermedia caratterizzata dalla presenza di livelli di HBV-DNA compresi fra 2000 e 20000 IU/mL e di valori di transaminasi normali.

SCOPO DEL LAVORO: Studiare la storia naturale dell'infezione da HBV nella fase HBeAg negativa in una coorte di 153 portatori cronici con viremia ≤ 20000 IU/mL e transaminasi nella norma alla prima osservazione, seguiti prospetticamente. E' stato valutato il comportamento virologico e clinico nel lungo termine per identificare i fattori associati alla transizione:

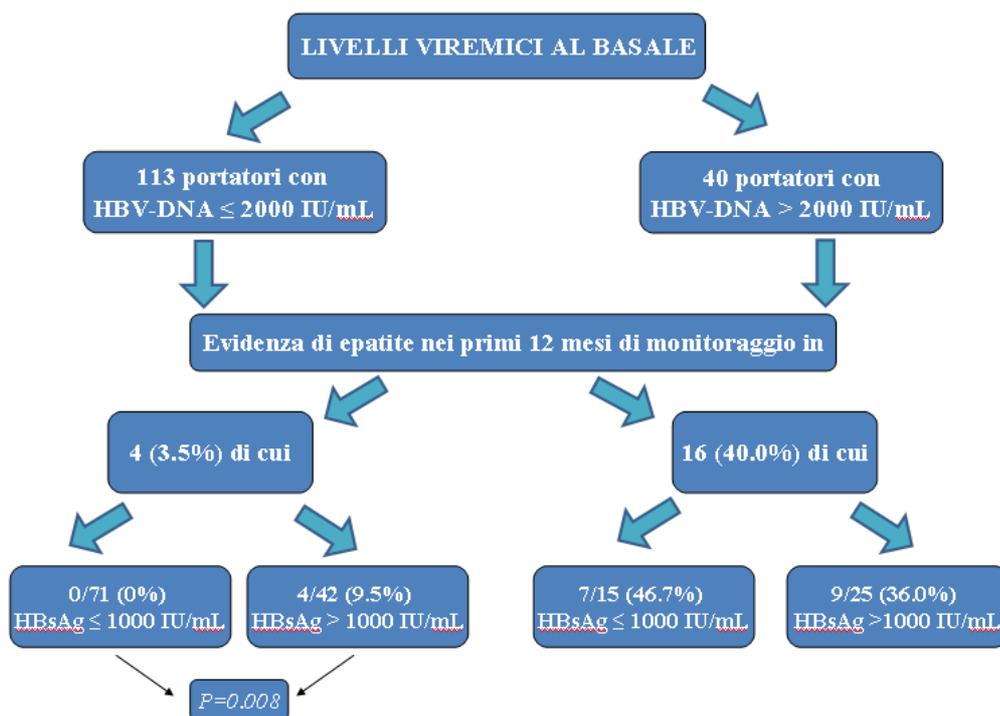
- da infezione conclamata ad occulta (perdita dell'HBsAg sierico con o senza sviluppo di anti-HBs),
- da infezione attiva a bassa replica (viremia sempre ≤ 20000 IU/mL) ad inattiva (viremia sempre ≤ 2000 IU/mL)
- da infezione inattiva ad attiva (riattivazione).

RISULTATI: I portatori sono stati sottoposti ad un monitoraggio trimestrale di 12 mesi per caratterizzare la fase di infezione e quindi ad un successivo follow-up per valutarne la storia naturale. Nei primi 12 mesi:

- 20 (13.1%) hanno sviluppato una riattivazione epatitica;

- 87 (56.9%) sono stati classificati come IC: nel corso del successivo follow-up 19 (21.8%) hanno perso l'HBsAg (10 con sieroconversione anti-HBs), mentre 3 (3.4%) hanno presentato transizione a LV-AC;
- 46 (30.0%) sono stati classificati come LV-AC: 20 (43.5%) sono successivamente diventati IC (2 con progressiva perdita dell'HBsAg), mentre solo 1 (2.2%) ha presentato riattivazione epatitica (CHB).

Dei 20 portatori con riattivazione nei primi 12 mesi di caratterizzazione virologica, al basale 16 avevano HBV-DNA >2000 IU/mL e gli altri 4 presentavano livelli di HBV-DNA ≤2000 IU/mL ma HbsAg >1000 IU/mL; nessuno di essi aveva livelli basali di HBV-DNA e HBsAg rispettivamente <2000 IU/mL e <1000 IU/mL.



Analizzando il sottogruppo dei portatori inattivi (IC), la perdita di HBsAg è risultata indipendentemente associata ai livelli basali di HBsAg ($P=0.009$), alla loro riduzione annuale ($P=0.010$) e alla durata del follow-up ($P=0.031$). Il genotipo virale diverso dal D ($P=0.038$) e l'origine non italiana ($P=0.049$) risultavano associati a livelli di HBsAg più elevati (>1000 IU/mL).

Nei LV-AC la presenza di livelli basali di HBsAg ≤ 2000 IU/mL è risultata l'unico parametro indipendentemente associato al raggiungimento di un più efficace controllo dell'infezione (passaggio ad IC) ($P=0.003$).

CONCLUSIONI: I risultati dello studio confermano la necessità di caratterizzare i portatori di HBsAg HBeAg negativi che alla prima osservazione presentano bassi livelli viremici (HBV-DNA < 20000 IU/mL) e transaminasi normali per il rischio di non diagnosticare una sottostante epatite cronica B in fase di transitoria remissione. La combinazione al basale di HBV-DNA ≤ 2000 IU/mL e HBsAg ≤ 1000 IU/mL permette di identificare con elevata accuratezza i portatori che non andranno incontro a riattivazione epatitica (valore predittivo negativo, PPN 100%), mentre un monitoraggio virologico e biochimico trimestrale per almeno 12 mesi dopo la prima osservazione permette di identificare la stragrande maggioranza dei portatori che svilupperanno un quadro di epatite B.

Nel portatore inattivo, ma con elevati livelli di HBsAg (> 1000 IU/mL), occorre tener conto delle variabili legate alle caratteristiche del virus (genotipo), dell'infezione e dell'ospite che possono giustificare elevati livelli dell'antigene anche in presenza di un efficace controllo della replicazione.

L'osservazione nel tempo dei portatori con bassi livelli di HBV-DNA al basale ha permesso di dimostrare che:

- i soggetti che mantengono livelli viremici ≤ 20000 IU/mL per 12 mesi hanno un rischio di riattivazione molto basso;
- coloro che sono stati classificati come LV-AC hanno elevata probabilità di diventare IC nel corso del monitoraggio, in particolare se presentano livelli basali di HBsAg < 2000 IU/mL;
- il 20% degli IC va incontro alla perdita dell'HBsAg nell'arco di 5 anni, transitando nella fase di infezione occulta.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. 2012.
“Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity”
Vaccine **30**:2212–2219
2. McMahon BJ.
“The natural history of chronic hepatitis B virus minfection”
Semin Liver Dis 2004; **24** Suppl 1: 17-21 [PMID:15192797 DOI: 10.1055/s-2004-828674]
3. Lee WM.
“Hepatitis B virus infection”
N Engl J Med. 1997;337:1733–1745
4. Mason WS, Burrell CJ, Casey J, Gerlich WH et al
“Virus Taxonomy”
Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier, 2005
5. Gust ID, Burrell CJ, Coulepis AG, Robinson WS, Zuckerman AJ
“Taxonomic classification of human hepatitis B virus”
Intervirology (1986); 25:14-29
6. Lanford R E, Chavez D, Brasky KM, Burns RB, Rico-Hesse R
“Isolation of Hepadnavirus from woolly monkey, a New World primate”
Proc. Natl Acad Sci USA (1998); 95(10);5757-61
7. Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS.
“A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans”.
Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 2941-2945

8. Summers J, Smolec JM, Snyder R et al
“A virus similar to human Hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks”
Proc Natl Acad Sci USA (1978); 75: 4533-4537

9. Mason WS, Seal G, Summers J et al
“Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus”
J Virol (1980); 36: 829-836

10. Guo H, Mason WS, Aldrich CE, Saputelli JR, Miller DS, Jilbert AR, Newbold JE.
“Identification and characterization of avihepadnaviruses isolated from exotic anseriformes maintained in captivity”
J Virol 2005; 79: 2729-2742

11. Schaefer S.
“Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes”
World J Gastroenterol 2007; 13(1): 14-21

12. Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R et al
“Molecular Biology of the Hepatitis B Virus for Clinicians”
J Clin Exp Hepatol (2012); 2(4): 353-365

13. Jung ML, Ahn H
“Quantification of HBsAg: basic virology for clinical practice”
Gastroenterology(2011); 17(3): 283-289

14. Seeger C, Ganem D, Varmus HE et al
“Biochemical and genetics evidence for the hepatitis B virus replication strategy”
Science (1986); 232 (4749): 477-484

15. Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Büscher M
“Replication strategy of human hepatitis B virus”
J Virol (1987); 61 (3): 904-911

16. Lien JM, Aldrich CE, Mason WS et al
“Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis”
J Virol (1986); 317: 489-496
17. Lutwick LI, Robinson WS et al
“DNA synthesized in the hepatitis B Dan particle polymerase reaction”
J Virol (1977); 21(3): 96-104
18. Tiollais Pourcel C, Dejean A et al
“ The Hepatitis B virus”
Nature (1985); 317:489-495
19. K H Heermann, U Goldmann, et al
“Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence”
J Virol. 1984 Nov; 52(2): 396–402.
20. Fernholtz D, Stemler M, Brunetto MR, Bonino F, Will H. et al
“Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein”
J Hepatology (1991); 13 Suppl 4: S102-4
21. Huovila AP, Eder AM, Fuller SD et al
“ Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment”
J Cell Biol (1992); 118(6): 1305-20
22. Heermann KH and Gerlich WH
“Molecular Biology of Hepatitis B virus ”
CRC press (1991)
23. Fernholz D, Stemler M, Brunetto M, Bonino F, Will H.
“Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce pre-S2 protein”
J Hepatol 13 [Suppl IV] : 102-104

24. Seeger C, Ganem D, Varmus HE
“Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy”
Science. 1986 Apr 25;232(4749):477-84.
25. Gerlich WH, Goldmann U, Müller R, Stibbe W, and Wolff W
“Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein Kinase”
J Virol (1982); 42(3): 761-6
26. Lan YT, Li J, Liao W, Ou J et al
“Roles of the three major phosphorylation sites of the hepatitis B virus core protein in viral replication”
Virology (1999); 259(2): 342-8
27. Watts NR, Conway JF, Cheng N, Stahl SJ, Belnap DM
“The morphogenetic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface”
EMBO j(2002); 2(5): 876-84
28. Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M
“Hepatitis B virus mutation in the core promoter for an antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen”
J Virol (1994); 68: 8102-8110
29. Laskus T, Rakela J, Tong MJ, Persing DH
“Nucleotide sequence analysis of the precore region in patients with spontaneous reactivation of chronic hepatitis B”
Dig Dis Sci (1994); 39: 2000-2006 84
30. Brunetto MR, Stemler M, Schdel F et al
“Identification of HBV variants which cannot produce precore derived HBeAg and may be responsible for severe hepatitis”
Ital J Gastroenterol (1989); 21: 151-154

31. Chang C, Enders G, Sprengel R, Peters N, Varmus HE and Ganem D
“Expression of the precore region of an avian hepatitis B virus is not required for viral replication”
J Virol. (1987); **61**(10):3322-5.
32. Chen HS, Kew MC, Hornbuckle WE, et al
“The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host”
J Virol. (1992); **66**(9):5682-4.
33. Milich DR, McLachlan A
“The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen”
Science 1986 Dec 12;234(4782):1398-401.
34. Milich DR, Chen M, Schödel F, Peterson DL, Jones JE, Hughes JL
“Role of B cells in antigen presentation of the hepatitis B core”
Proc Natl Acad Sci U S A. **1997** Dec 23;94(26):14648-53
35. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N et al
“Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements”
EMBO J (1989); 8: 3867-3874
36. Weber M, Bronsema V, Bartos H, Bosserhoff A, Bartenschlager R
“Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription”
J Virol (1994); 68: 2994-2999
37. Zoulim F, Locarnini S
“Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues”
Gastroenterology (2009); 137: 1593-1608

38. Lanford RE, Kim YH, Lee H, Notvall L, Beames B
“Mapping of hepatitis B virus reverse transcriptase TP and RT domains transcomplementaion for nucleotide priming and by protein-protein interaction”
J Virol (1999); 73: 1885-1893
39. Wei X, Darrel LP
“Expression, purification and characterization of an active RNase H domain of the hepatitis B viral polymerase”
J Biol Chem (1996); 32617-32622
40. Tweu JS, Schloemer R H
“Transcriptional trans-activating function of the hepatitis B virus”
J Virol (1987); 61:20-30
41. Andrisani OM, Barnabas S
“The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its rule in hepatocarcinogenesis”
Int J Oncol (1999); 15: 373-9
42. Bouchard MJ, Schneider RJ
“The enigmatic X gene of heptitis B virus”
J Virol (2004); 78: 12725-34
43. Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S
“Molecular functions and biological roles of the hepatitis B virus X protein”
Cancer Sci (2006); 97: 977-83
44. Ganem D and Alfred M. Prince, M.D.
“Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences”
N Engl J Med 2004; 350:1118-1129 March 11, 2004
45. Chouteau P, Le Seyec J, Gripon P et al
“A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificities of human hepatitis B virus”

J Virol (2001); 75 (23): 11565-11572

46. Urban S, Gripon P

“Inhibition of duck hepatitis B virus infection by a myristoylated pre-S peptide of the large viral surface protein”

J Virol (2002); 76 (4): 1986-1990

47. Yan Huan, Guocai Zhong, Guangwei Xu, et al

“Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus”

eLife 2012;1:e00049

48. Yan Huan, Bo Peng, Yang Liu et al

“Viral Entry of Hepatitis B and D Viruses and Bile Salts Transportation Share Common Molecular Determinants on Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide”

J Virol. 2014 Mar; 88(6): 3273–3284

49. Köck J, Borst EM, Schlicht HJ.

“Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment”

J Virol 1996; 70: 5827-5831

50. Michael Kann, André Schmitz, Birgit Rabe

“Intracellular transport of hepatitis B virus”

World J Gastroenterol 2007; 13(1): 39-47

51. Siger C, Mason WS

“Replication of the hepatitis virus genome”

In M.P.L. De Pamphilis(ed), DNA replication in eukaryotic cells (1996) pp.815-831 Cold Spring Harbor Laboratory Press P, Cold Spring Harbor, NY

52. Bartenschlager R and Schaller H

“Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome”

EMBO J (1992); 11(9):3413-3420.

53. Juergen Beck and Michael Nassal
“Hepatitis B virus replication”
World J Gastroenterol. 2007 Jan 7; 13(1): 48–64. Published online 2007 Jan 7.
54. T. Nagaya, T. Nakamura, et al
“The mode of hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma”
Genes Dev. 1987 Oct;1(8):773-82.
55. Murakami Y, Saigo K, Takashima H, et Minami M, Okanoue T, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P
“Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas”
Gut. 2005 Aug;54(8):1162-8
56. Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M
“Genomic heterogeneity of the hepatitis B virus in a 54-year old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission”
Jpn J exp med (1987); 57:231-236
57. Miller R H, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH
“Compact organization of the hepatitis B virus genome”
Hepatology (1989); 9: 322-327
58. Summers J, Mason W
“Residual integrated viral DNA after hepadnavirus clearance by nucleoside analog therapy”
Proc Acad Sci USA (2004); 101: 638-640
59. Girones R, Miller RH
“Mutation of the hepadnavirus genome”
Virology (1989); 170: 595-597

60. Neurath A R, Kent SB, Adamowicz P, Riottot MM, Price P et al
“Antibodies to a synthetic peptide from the pre-S2 120145 of the hepatitis B virus envelope are virus-neutralizing”
Vaccine (1986); 4: 35-41
61. Jin Y, Shih WK, Berkower I
“Humans T-cell response to the surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg)”
J Exp Med (1995); 186: 293-299
62. Carman W F, Korula J, Wallace L, MacPhee R, Mimms L et al
“Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA”
Lancet (1995); 24 (3): 489-93
63. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G et al
“Vaccine induced escape mutant of hepatitis B virus”
Lancet (1990); 336: 325-329
64. Carman WF, Van Deursen FJ, et al
“The prevalence of surface antigen variants of hepatitis B virus in Papua New Guinea, South Africa, and Sardinia”
Hepatology (1997);26:1658–1666
65. Oon CJ, Chen WN, Koh ES, Lim EGK
“Identification of secretion of the hepatitis B virus major surface antigen by the pre-S1 protein”
J Virol (1987); 61: 782-786
66. Kay A, Zoulim F
“Hepatitis B virus genetic variability and evolution”
Virus research (2007); 127: 164-176
67. Brunetto MR, Rodriguez UA, Bonino F
“Hepatitis B virus mutants”

Intervirology (1999); 42: 69-80

68. Hadziyannis S, Gerber MA, Vissoulis C, Popper H

“Cytoplasmatic hepatitis B antigen in “ground glass” hepatocytes of carriers”

Arch Pathol (1973), Nov; 96 (5): 327-30

69. Brunetto MR, Oliveri F, Rocca G, Criscuolo D, Chiaberge E, et al

“Natural course and response to interferon of chronic hepatitis B accompanied by antibody to hepatitis e antigen”

Hepatology (1989); 10: 198-202

70. Lok AS, Lai CL, Wu PC, Leung EK, Lam TS

“Spontaneous hepatitis e antigen to antibody seroconversion and reversion in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection”

Gastroenterology (1997); 92: 1839-1843

71. Yuh C H, Chang Y L, Ting L P

“Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus”

J Virol (1992); 66 (7): 4073-4084

72. Tisdale M, Kemp SD, Parry NR, Larder BA

“Rapid in vitro selection of human immune deficiency virus type-1 resistant to 3-thiacytidine inhibitors due to mutation in the YMMD region of reverse transcriptase”

Proc Nat Acad Sci USA (1993); 90: 5653-5656

73. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M et al

“Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes”

J Gen Virol (1988); 69: 2575-2583

74. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M et al

“A new Genotype of Hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness”

J Gen Virol (2000); 81: 67-74

75. Chu CM, Liaw YF
“Natural history differences in perinatally versus adult-acquired disease”
Current Hepatitis Report (2004); 11: 97-107
76. Hadziyannis S J
“Non parental transmission of viral Hepatitis in Greece”
Am J Med Sci (1975); 270: 313-318
77. Liaw YF Chu CM
“Hepatitis B virus infection”
Lancet (2009); 373: 582-592
78. Lavanchy D
“Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment and current and emerging prevention and control measures”
J Viral Hepat (2004); 11: 97-107
79. Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, Chisari FV
“High level of hepatitis replication in transgenic mice”
J Virol (1995); 69: 6158-69
80. Ferrari C, Chisari FV
“Immunopathogenesis of hepatitis B”
J Hepatol (2003); 39: S36-42
81. Bertoletti A, Ferrari C
“Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection”
Hepatology (2003); 38 (1): 4-13
82. De Franchis R, Meucci G, Vecchi M, Tatarella M, Colombo M et al
“The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers”
Ann intern Med (1993); 6: 75-85

83. Colloredo G, Bellati G, Leandro G, Colombatto P, Rho A, Bissoli F, Brunetto MR, Angeli G, Ideo G, Bonino F
“Quantitative analysis of IgM antiHBc in chronic hepatitis B patients using a new “gray-zone” for the evaluation of “border line” values”
J Hepatol (1996); 25(5): 644-648
84. Brunetto MR, Oliveri F, Bonino F
“Diagnosi etiologica dell’epatite in corso di infezione virale”
Ligandassay (2001); 6: 75-85
85. Bonino F, Hoyer B, Nelson J, Engle R, Verme G et al
“Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers- a marker of active hepatitis B virus”
Hepatology (1981); 1: 386-391
86. Bonino F
“The importance of hepatitis B viral DNA in serum and liver”
Hepatology (1986); 3: 136-41
87. Bonino F, Brunetto MR, Rizzetto M, Will H
“ Hepatitis B virus unable to secrete e antigen”
Gastroenterology (1991); 110: 1138-1141
88. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS
“Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers”
Gastroenterology 2003 Feb;124(2):327-34
89. Bortolotti F, Cadrobbi P, Crivellaro C, Guido M, Rugge M et al
“Long-term outcome of chronic type B hepatitis in patients who acquire hepatitis B virus infection in childhood”
Gastroenterology (1990); 99: 805-10

90. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F
“Natural history of hepatitis B”
J Hepatol (2003); 39: S50-58
91. Brunetto M R, Oliveri F, Coco B, Leandro G, Colombatto P et al
“The outcome of chronic hepatitis B in alpha interferon treated and untreated patients: a long term cohort study”
J Hepatol (2002); 36: 263-270
92. Bonino F Piratvisuth T Brunetto MR, Liaw YF
“Diagnostic markers of chronic hepatitis B infection and disease”
Antiviral Therapy (2010); 15Suppl3: 35-44
93. Liaw Y-F, Kao J-H, Piravitvisuth T et al
“Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2012 update”
Hepatol Int (2012); 6: 531-561
94. European association for the study of the liver
“EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection”
J Hepatol. 2012 Jul;57(1):167-85. doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.010. Epub 2012 Mar 20.
95. Brunetto MR
“A new role for an old maker, HBsAg”
J Hepatol (2010); 52(4): 475-7
96. Nguyen T, Thompsn AJV, Bowden S, Croagh C, Bell S et al
“Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: a perspective on Asia”
J Hepatol (2010); 52: 508-513

97. Jaroszewicz J, Serrano BC, Wursthorn K, Deterding K, Schlue J et al
“Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective”
J Hepatol (2010); 52: 514-522
98. Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P et al
“Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers”
Gastroenterology (2010); 139: 483-490
99. Tseng TC, Liu CJ, Yang HC et al
“Serum hepatitis B surface antigen levels help predict disease progression in patients with low hepatitis B virus loads”
Hepatology (2013); 57(2): 441-50
100. Bonino F
“Introduction to “Hepatitis B virus heterogeneity - a mean to personalized care”
Antiviral Therapy (2010); 15 Suppl 3: 1-2
101. Rijckborst V, Janssen H
“The role of Interferon in hepatitis B therapy”
Curr Hepatitis Rep (2010); 9: 231-238
102. Marcellin P, Liang J
“A personalized approach to optimize hepatitis B treatment in treatment naïve patients”
Antiviral Therapy (2010); 15 Suppl 3: 53-59
103. Pei RJ, Chen XW, Lu MJ.
“Control of hepatitis B virus replication by interferons and Toll-like receptor signaling pathways”
World J Gastroenterol 2014; 20(33): 11618-11629

104. Hadziyannis S, Papatheodoridis GV.
“Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis: natural history and treatment”
Semin Liver Dis 2006;26:130-141
105. Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, et al.
“Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States”
Hepatology 2003;38:619-628
106. Gaeta GB, Stornaiuolo G, Precone DF, et al.
“Epidemiological and clinical burden of chronic hepatitis B virus/hepatitis C virus infection. A multicenter Italian study”
J Hepatol 2003;39:1036-1041
107. Zarski JP, Marcellin P, Leroy V, et al.
“ Characteristics of patients with chronic hepatitis B in France: predominant frequency of HBe antigen negative cases”.
J Hepatol 2006;45:355-360
108. Lok ASF, McMahon BJ.
“Chronic Hepatitis B”
Hepatology 2007;45:507-539
109. Fattovich G, Brollo L, Alberti A, et al.
“Long-term follow-up of anti-HBe-positive chronic active hepatitis B”.
Hepatology 1988;8:1651–1654
110. Iloeje UH, Yang HI, Jen CL, et al.
“Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load”
Gastroenterology 2006;130:678–686
111. Huo TI, Wu JC, Hwang SJ, et al
“Factors predictive of liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B: a multivariate analysis in a longitudinal study”.
Eur Gastroenterol Hepatol 2000;12:687–693

112. Chu CM, Liaw YF.
“Chronic hepatitis B virus infection acquired in childhood: special emphasis on prognostic and therapeutic implication of delayed HBeAg seroconversion”
J Viral Hepat 2007;14:147–152
113. Perrillo R.
“Benefits and Risks of Interferon Therapy for Hepatitis B”
Hepatology 2009;49:103–111
114. Chen CJ, Yang H, Iloeje UH for the Reveal-HBV Study Group.
“Hepatitis B Virus DNA Levels and Outcomes in Chronic Hepatitis B”
Hepatology 2009;49:72–84
115. Feld JJ, Ayers M, El-Ashry D et al.
“Hepatitis B virus DNA prediction rules for Hepatitis B e Antigen Negative Chronic Hepatitis B”
Hepatology 2007;46(4):1057-70
116. Papatheodoridis GV, Manesis EK, Manolakopoulos S, et al.
“Is there a meaningful serum hepatitis B virus DNA cutoff level for therapeutic decisions in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B virus infection?”
Hepatology 2008;48(5):1451–1459
117. Ozer J, Ratner M, Shaw M et al.
“The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity”
Toxicology 2008; 245(3):194-205
118. Jay H. Hoofnagle
“Reactivation of Hepatitis B”
Hepatology. 2009 May;49(5 Suppl):S156-65. doi: 10.1002/hep.22945

119. Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Laouénan C, et al
“Prediction of disease reactivation in asymptomatic hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients using baseline serum measurements of HBsAg and HBV-DNA”
J Clin Virol.2013 Oct;58(2):401-7. doi: 10.1016/j.jcv.2013.08.010. Epub 2013 Aug 16.
120. Rafael Bárcena Marugán and Silvia García Garzón
“DNA-guided hepatitis B treatment, viral load is essential, but not sufficient”
World J Gastroenterol. 2009 Jan 28; 15(4): 423–430
121. Sanjeev Kumar Sharma, Nitin Saini and Yogesh Chwla
“Hepatitis B Virus: Inactive carriers”
Virology Journal 2005, 2:82 doi:10.1186/1743-422X-2-82
122. Eleni Gigi, Thalia Lalla, Eleni Orphanou, et al
“Long Term Follow-Up of a Large Cohort of Inactive HBsAg (+)/HBeAg (-)/ anti-HBe (+) Carriers in Greece”
J Gastrointestin Liver Dis 2007 Mar;16(1):19-22.
123. Mori S, Fujiyama S
“Hepatitis B virus reactivation associated with antirheumatic therapy: Risk and prophylaxis recommendations”
World J Gastroenterol 2015 Sep 28;21(36):10274-89. doi: 10.3748/wjg.v21.i36.10274.
124. Han JW, Yang H, Lee HL, et al
“Risk factors and outcomes of hepatitis B virus reactivation in hepatitis B surface antigen-negative patients with hematological malignancies”
Hepatol Res.2015 Oct 7. doi: 10.1111/hepr.12603. [Epub ahead of print]
125. Ballanti E., Conigliaro P., Chimenti MS, et al
“Use of anti-tumor necrosis factor alpha therapy in patients with concurrent rheumatoid arthritis and hepatitis B or hepatitis C: a retrospective analysis of 32 patients”
2014 Nov;75 Suppl 1:S42-5. doi: 10.1002/ddr.21193.

126. Lu K, Wang HP, Chen YS

“Outcomes of kidney transplantation recipients with hepatitis in the antiviral therapy era: a single-center experience”

2014;46(2):460-3. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.041

127. Chan HLY

Response-guided therapy by hepatitis B surface antigen level for peginterferon therapy: What is next?

Journal of Gastroenterology and Hepatology, Volume 27, Issue 3, pages 420–421, March 2012

128. Janssen HL, Sonneveld MJ, Brunetto MR.

“Quantification of serum hepatitis B surface antigen: is it useful for the management of chronic hepatitis B?”

Gut. 2012 May;61(5):641-5. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301096. Epub 2011 Dec 16

9. RINGRAZIAMENTI

Vorrei iniziare ringraziando il Prof. Ferruccio Bonino e la Prof.ssa Maurizia Brunetto, che con il loro carisma, l'entusiasmo e la passione per "l'universo epatologico", mi hanno affascinato e gentilmente permesso di frequentare in questo anno e mezzo, in modo tale da avvicinarmi all'epatologia, e potendo spaziare tra tutte le attività del reparto ho potuto prendere sempre più confidenza della materia che poi è diventata oggetto del mio progetto di tesi.

Un grazie va a tutta l'UO di Epatologia, una grande famiglia composta da persone estremamente eterogenee ma accomunate da un unico obiettivo, che mi hanno insegnato ciascuno qualcosa e permesso di capire quanto sia complesso, ma necessario, il lavoro di gruppo, facendomi sentire sempre più parte della "squadra".

Non posso fare altro che passare in rassegna tutta l'equipe, quindi ringrazio la Dr.ssa Lidia Surace per il lavoro fondamentale svolto nella raccolta dati per la costruzione del database del suo progetto, diventato poi anche oggetto della mia tesi, il Dr. Filippo Oliveri per la pazienza e la dovizia di particolari con cui ha svolto le analisi statistiche necessarie per impostare tutta la parte sperimentale, la Dr.ssa Daniela Cavallone per l'infinito lavoro di laboratorio che svolge quotidianamente e che senza il quale nessuno studio potrebbe nemmeno iniziare, la Dr.ssa Veronica Romagnoli e la Dr.ssa Barbara Coco che tanto hanno saputo trasmettermi, sia dal punto di vista professionale che da quello umano, facendomi spesso sorridere con i simpatici aneddoti riguardanti i figli, il Dr. Antonio Salvati (Anto per gli amici), l'ultimo arrivato, con cui ho condiviso ansie e schizofrenie di questi ultimi 2 mesi.

Una menzione speciale va al Dr. Piero Colombatto, al quale, durante tutto il mio lungo periodo da *frequentante*, ho potuto "rubare un po' il mestiere" e che ha fatto funzione di tutor, consigliere, insegnante di "epatoburocrazia", e che strada facendo mi ha trattato sempre più come un collega.

Grazie ai miei cari amici, quelli con la "A" maiuscola, che nonostante le mie tante assenze durante questi anni tanto faticati mi sono sempre stati vicini.

Un grazie infinito ai miei genitori, a mio nonno e a mio fratello Filippo (il Prof. Piti) che durante il mio percorso lungo e tortuoso mi hanno sempre supportato e sopportato, permettendomi di affrontare il tutto nei migliori dei modi.

Infine gli ultimi miei 2 grazie spettano: uno a chi ora non c'è più, almeno fisicamente parlando, e che nei miei primi anni di università mi disse: “Tieni sempre duro. Più la strada è difficile, più sarà grande la soddisfazione. E ricorda che sei buono, le persone lo capiscono e ti vorranno bene”, e uno ad una persona che è stata al mio fianco per moltissimo tempo e con la quale ho condiviso tutto negli ultimi anni, ma che ora ha intrapreso un sentiero diverso dal mio e a cui auguro tutto il bene del mondo.