

CARATTERIZZAZIONE CLINICA, SIEROLOGICA E MOLECOLARE DELLE INFEZIONI ACUTE DA VIRUS DELL'EPATITE B IN ITALIA

Ornella Zuccaro (a), Claudio Galli (b)

(a) *Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Divisione Diagnostici, ABBOTT srl, Roma*

Il quadro epidemiologico dell'epatite B in Italia ha subito un profondo mutamento nelle ultime due decadi. I determinanti di questo cambiamento sono stati diversi: le migliorate condizioni igieniche e socio-economiche, la riduzione della dimensione dei nuclei familiari (minor circolazione intra-familiare del virus), una maggiore conoscenza sulle vie di trasmissione e una migliore prevenzione (screening delle donazioni di sangue con metodi maggiormente sensibili, screening per HBsAg nelle gravide e profilassi nei nati da madri HBsAg+), l'implementazione delle precauzioni universali (introduzione di materiale sanitario monouso) e la campagna informativa contro l'infezione da HIV. La vaccinazione contro l'epatite B ha contribuito in modo significativo alla riduzione del numero delle nuove infezioni da HBV: in Italia la campagna vaccinale inizia nel 1983 per persone appartenenti a gruppi ad alto rischio di infezione da HBV (*Hepatitis B Virus*) e nel 1991 diviene obbligatoria per tutti i nuovi nati e per i dodicenni, rimanendo fortemente consigliata per i gruppi a rischio e offerta loro gratuitamente.

Il quadro clinico, virologico e sierologico dell'epatite acuta B è stato delineato nelle sue caratteristiche essenziali già da lungo tempo. Tuttavia, stante l'accumularsi di conoscenze e considerando anche le importanti ricadute che si potrebbero avere dal punto di vista diagnostico, prognostico e terapeutico, si rende sempre più necessario trovare delle risposte ad alcune questioni che rimangono tuttora aperte.

Molto sappiamo oggi delle infezioni croniche da HBV. Attualmente in Italia la maggior parte delle epatiti B croniche è causata dal ceppo mutante "e-minus" che, pur mantenendo la capacità di replica e l'infettività, non è in grado di produrre l'antigene HBeAg, in conseguenza di mutazioni nella regione pre-core/core. Tale mutante causa una malattia di una certa gravità, meno sensibile rispetto alle infezioni da ceppo "wild type" alla terapia antivirale. Sono stati documentati inoltre mutanti dell'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg) a livello del determinante comune "a", in grado di sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite (mutanti "escape"). Essi si caratterizzano per la presenza di infezione attiva (positività per HBsAg e HBV-DNA) in soggetti apparentemente immuni (positività per anti-HBs). Questo fenomeno è favorito dalla pressione selettiva del trattamento vaccinale e/o delle immunoglobuline in soggetti particolarmente esposti all'infezione, è stato inizialmente descritto in bambini nati da madre HBsAg+ e trattati alla nascita con profilassi passiva-attiva ed è stato notato anche in pazienti sottoposti a trapianto di fegato e trattati con dosi elevate di gammaglobuline iperimmuni anti-HBV.

Pochi dati sono invece disponibili sulla presenza e sull'impatto clinico dei mutanti "e-minus" nelle epatiti acute B (EAB) e nella popolazione aperta esistono solamente segnalazioni sporadiche di EAB da mutanti "escape".

Recenti studi suggeriscono inoltre un'associazione, in particolari aree geografiche, tra alcuni genotipi e il decorso clinico e la risposta alla terapia dell'infezione cronica. Il genotipo D è

quello nettamente prevalente nelle infezioni croniche da HBV in Italia, ma anche in questo campo non vi sono dati sistematici sulla distribuzione dei genotipi nelle EAB.

Da tutte queste premesse è nato lo studio GISEBA (Gruppo Italiano per lo Studio dell'Epatite B Acuta). Lo scopo di questo studio era analizzare le caratteristiche clinico-virologiche delle EAB che si verificano attualmente in Italia, analizzando un ampio campione di soggetti affetti da questa malattia.

Gli obiettivi specifici erano:

- 1) Ottenere un quadro aggiornato sulle caratteristiche virologiche delle “nuove” infezioni da HBV a livello nazionale (genotipo, mutazioni nelle regioni core/pre-core ed S, durata della viremia).
- 2) Valutare l'andamento dei marcatori sierologici di infezione da HBV, e segnatamente i livelli di HBsAg e di IgM anti-HBc, le dinamiche del sistema HBe/anti-HBe e la comparsa di anti-HBs.
- 3) Correlare tali caratteristiche virologiche e sierologiche con l'evoluzione clinica dell'infezione (gravità, tasso di cronicizzazione).

Per tali scopi, sono stati arruolati dal luglio 2005 a gennaio 2007 tutti i casi consecutivi di EAB diagnosticati presso 15 unità di malattie infettive in 8 Regioni italiane. I criteri di inclusione sono stati: positività per IgM anti-HBc, livelli di alanina aminotransferasi (ALT) oltre 10 volte il massimo del valore normale e un quadro clinico compatibile con una epatite acuta. Sono stati esclusi dallo studio i soggetti con positività per IgM anti-HAV, i portatori cronici di HBV noti e soggetti con epatopatia acuta da altre cause, diverse da HBV.

Per i pazienti arruolati è stata fatta una valutazione dei parametri biochimici (ALT, AST, bilirubina) con metodiche standard, virologici (HBsAg quantitativo, anti-HBc, HBeAg, anti-HBeAg, anti-HBc/IgM, anti-HBs) con metodi automatizzati in chemiluminescenza e HBV DNA mediante real-time PCR. Le determinazioni sono state effettuate al momento del ricovero e poi dopo 7, 15, 30 giorni, e 3, 6, 9 e 12 mesi dall'esordio della malattia.

La determinazione del genotipo HBV, dei mutanti nella regione core/precore e quelli nella regione S, è stata prevista solo nel primo campione di siero HBV DNA positivo.

Mediante apposite schede (SEIEVA + scheda clinica “ad hoc”) si è provveduto alla raccolta dei dati demografici, epidemiologici e clinici all'arruolamento e dei dati clinici di follow-up.

Risultati

Sono stati arruolati in totale 103 casi consecutivi di EAB (68% maschi; mediana età, 37 anni; range, 16-80 anni). Al momento della prima determinazione tutti i pazienti tranne uno erano positivi per HBsAg. Tutti avevano un'infezione sintomatica, che nel 93% dei casi includeva la comparsa di ittero. Il 22,5% dei casi presentava anche steatosi di grado moderato/severo. Il valore mediano delle ALT e delle AST era rispettivamente di 2.431 IU/L (range 851-6.324) e 1.836 IU/L (range 321-5.558), e la mediana dei livelli di bilirubina era di 15 mg/dL (range 1,1-48,9).

La genotipizzazione del virus HBV è stata eseguita su 99 pazienti (96%): di essi, 49 (49%) erano infettati da HBV genotipo D, 44 (44%) da HBV genotipo A e 6 (6%) da HBV genotipo F. La prevalenza delle mutazioni core e precore è stata 3,3% (3/93) e 11,8% (11/93) rispettivamente; nel 7,5% dei pazienti (7/93) è stata trovata una doppia mutazione core/precore. La proporzione totale di queste varianti è stata significativamente più alta nei soggetti HBeAg negativi.

Una positività per HBeAg sul primo campione disponibile, ottenuto in media $14,4 \pm 9,4$ giorni dopo l'esordio clinico (mediana: 12) era rilevabile nel 65,7% dei casi, con notevoli differenze

legate al genotipo: infatti, mentre questo marcatore era rilevabile al ricovero, da solo o in associazione con anti-HBe, nell'88,6% dei pazienti infetti con genotipo A, la positività era riscontrabile solamente nel 47,3% dei pazienti infetti da genotipo D o F ($p < 0,001$).

Il valore mediano di HBsAg all'esordio era 23.995 UI/mL (range 0,05->300.000) e la mediana dei livelli di HBV DNA era di 110.683 UI/mL (range 7-150x10⁶). Anche in questo caso vi era una differenza legata al genotipo: i pazienti infettati da genotipo A presentavano valori più elevati sia di HBsAg che di HBV-DNA (mediane: 35.530 e 207.745 UI/mL) rispetto ai pazienti infettati da genotipo D o F (mediane: 14.920 e 81.449 UI/mL).

Un'analisi del decorso dell'infezione è stata eseguita su 72 dei 103 pazienti (69,9%), per i quali erano disponibili sia i dati clinici che i prelievi per tutta la durata prevista del follow-up. La negativizzazione di HBsAg si è verificata complessivamente in 70 casi su 72 (97,2%): entro il terzo mese per 22 pazienti (31,4%), tra il terzo e il sesto mese per 23 pazienti (32,9%) e al sesto mese per 25 pazienti (35,7%). Due pazienti donne, di età superiore ai 50 anni erano ancora positive per HBsAg, anche se a bassi livelli (0,73 e 0,53 UI/mL) al momento dell'ultima determinazione, rispettivamente dopo 202 e 195 giorni dall'esordio, ed hanno quindi apparentemente cronicizzato l'infezione: una di queste pazienti è stata infettata da un ceppo mutante di HBV genotipo A e l'altra da HBV genotipo D wild-type.

Le IgM anti-HBc mostravano una positività persistente per diversi mesi dopo l'esordio clinico, con un calo progressivo dei livelli: dopo 3 mesi dall'esordio erano ancora rilevabili nel 93% dei casi e dopo 6 mesi nel 70% dei casi.

Il comportamento degli anticorpi anti-HBs era estremamente variabile, sia come presenza che come livelli: una positività (≥ 3 mIU/mL) era rilevabile contemporaneamente alla presenza di HBsAg già nella prima settimana dal ricovero nel 10% dei pazienti. Dopo 3 mesi il 55,2% dei pazienti presentava livelli rilevabili di anti-HBs e la percentuale saliva all'85,2% dopo 6 mesi.

Tra i pazienti arruolati 5 (5,3%; 2 maschi e 3 femmine di età 19-44 anni) avevano ricevuto dosi di vaccino anti-HBV prima della comparsa della malattia. Di questi pazienti 2 avevano ricevuto 3 dosi (uno nel 1991 e l'altro nel 1999; uno di tali pazienti è stato infettato da HBV genotipo D, l'altro da HBV genotipo F); 2 avevano ricevuto 2 dosi di cui l'ultima 18 giorni, in un caso, e 123 giorni, nell'altro caso, prima dell'esordio della malattia. Per l'ultimo soggetto segnalato come già vaccinato non erano disponibili informazioni né sul numero di dosi né sull'epoca di somministrazione. Quattro di questi pazienti, per i quali erano disponibili dati completi per quanto riguarda entrambi i marcatori HBeAg e anti-HBe, erano HBeAg positivi e anti-HBe negativi. Quattro erano infetti da HBV genotipo D, uno da genotipo F e non sono stati riscontrati mutanti nelle regioni core/pre-core ed S: queste ultime sono state ad ora ricercate solo in questi pazienti.

Quattro pazienti (4,5%; 2 maschi e 2 femmine d'età minore di 46 anni) subito dopo l'ammissione hanno sviluppato un'epatite fulminante: uno è deceduto, 2 sono stati sottoposti a trapianto di fegato e uno è stato perso al follow-up (ha avuto una remissione dei sintomi). Nessuno dei pazienti con epatite fulminante aveva coinfezioni con HCV o HIV; 1 di questi aveva una severa steatosi, ma era il paziente andato incontro a remissione spontanea.

Non sono state osservate differenze significative tra soggetti infettati da HBV genotipo D e quelli infettati da HBV genotipo non-D per quanto riguarda l'età, la mediana dei valori di ALT/AST all'esordio e il decorso clinico. I pazienti infettati da HBV genotipo non-D sono più frequentemente maschi, hanno più alti livelli di bilirubina e una maggiore carica virale all'esordio, sono maggiormente infettati da ceppi mutanti e inoltre sono più frequentemente HBeAg positivi e anti-HBe negativi all'esordio. Nei pazienti infettati da HBV genotipo D la prevalenza di mutazioni core è significativamente più alta. Essi inoltre sono più frequentemente nati all'estero (Europa dell'Est in particolare) e la maggior parte di questi vive nel Sud d'Italia. Per quanto riguarda i fattori di rischio, l'uso di droghe per via endovenosa è stato riportato

soprattutto da pazienti infettati da HBV genotipo D; al contrario, il fattore di rischio sessuale (sia attività sessuale promiscua che rapporti occasionali) è stato più frequentemente riportato da pazienti infettati da HBV genotipo non-D (genotipo A in particolare).

Conclusioni

Il quadro epidemiologico dell'epatite B in Italia, soprattutto grazie all'introduzione della vaccinazione obbligatoria per i nuovi nati e per i dodicenni nel 1991, è cambiato radicalmente negli ultimi 20 anni e ora l'incidenza di EAB è 0,9 per 100.000, mostrando valori più alti per i soggetti di età superiore ai 25 anni.

Come riportato anche da studi recenti (1-4), il virus HBV genotipo D è stato responsabile per decenni di almeno il 95% dei casi di EAB osservati in Italia. Ora però si assiste ad un sostanziale e progressivo cambiamento: è in aumento il numero di casi di EAB dovuti a HBV genotipo non-D e ciò è verosimilmente legato all'aumentato flusso migratorio in Italia negli ultimi 10 anni, in particolare da aree ad alta endemia per HBV (Africa Sud-Sahariana, Europa dell'Est). Ciò ha comportato l'introduzione di nuovi genotipi di HBV, fatto confermato anche dal presente studio. Tuttavia, rispetto ad altri studi che riportano infezioni da HBV non-D soprattutto genotipo E, i nostri dati mostrano una maggiore diffusione dei genotipi A e F, e oltretutto la diffusione di tali genotipi non riflette l'etnia dei pazienti: quasi tutti i casi da noi arruolati, infettati da HBV genotipo non-D, sono Italiani. I nostri dati inoltre confermano che i tossicodipendenti presentano più frequentemente infezioni da genotipo D, gli omosessuali da genotipo A e gli eterosessuali da genotipo F; altro dato emergente è il sostanziale cambiamento nel ruolo dei fattori di rischio associati a EAB, con un numero aumentato di casi che riportano come fattore di rischio quello sessuale.

Bibliografia

1. Coppola N, Masiello A, Tonziello G, Pisapia R, Pisaturo M, Sagnelli C, Messina V, Iodice V, Sagnelli E. Factors affecting the changes in molecular epidemiology of acute hepatitis B in a Southern Italian area. *J Viral Hepat* 2010;17(7):493-500.
2. Scalia G, Russo R, Palermo I, Gussio M, Bellissimo F, Fatuzzo F, Montineri A, Patamia I, Costanzo M, Zappala D, Russo R, Cacopardo B. Clinical, virological and epidemiological aspects of acute B hepatitis in the Catania area (Italy). *Infez Med* 2010;18(3):169-74.
3. Palumbo E, Scotto G, Cibelli DC, Faleo G, Saracin A, Angarano G. Immigration and hepatitis B virus: epidemiological, clinical and therapeutic aspects. *East Mediterr Health J* 2008;14(4):784-90.
4. Scotto G, Martinelli D, Di Tullio R, Fazio V. Epidemiological and Clinical Features of Hepatitis B Virus Genotypes among Immigrants in Southern Italy. *Hepat Res Treat* 2010;2010:878356.