

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

Virus dell'epatite B

**Epidemiologia; biologia del virus; infettività; importanza diagnostica
e predittiva dell'HBV DNA quale indice diretto di replicazione virale**

C. Delfini* e T. Stroffolini**

** Laboratorio di Biologia cellulare*

*** Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica*

Roma, aprile 1986

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite B (HBV) è causa estremamente frequente di patologia epatica sia acuta che cronica (cirrosi e carcinoma epatocellulare). In Italia ogni anno si stimano in non meno di 90.000 i casi di epatite acuta; oltre 18.000 soggetti muoiono per cirrosi epatica post-epatitica e circa 1.800 per cancro primitivo del fegato. Si stima che al mondo esistano circa 200 milioni di portatori cronici dell'antigene di superficie (HBsAg) del virus B (viene definito portatore cronico il soggetto nel cui siero l'HBsAg persiste per più di 6 mesi), il 25% dei quali è destinato a morire nel giro di alcuni anni per cirrosi e/o cancro del fegato (1); ogni anno circa 350.000 portatori cronici nel mondo muoiono per cancro del fegato (2). Una forte associazione è stata infatti trovata fra condizione di portatore cronico e incidenza di carcinoma epatocellulare: lo studio prospettico condotto in Taiwan ha evidenziato che la probabilità di morire di cancro primitivo del fegato per un portatore cronico di media età è 223 volte più elevato che per il non portatore (3).

La diffusione dell'infezione da HBV è estremamente variabile nelle differenti aree geografiche, sia per quel che concerne il numero delle persone che nel passato sono state colpite dal virus e oggi sono guarite (soggetti nel cui siero è scomparso l'HBsAg ed è comparso il rispettivo anticorpo anti-HBs), sia per quanto riguarda i portatori cronici (HBsAg positivi e anti-HBs negativi). Nel mondo vengono identificate tre grosse aree di diffusione (4) mostrate in Fig. 1. Una prima area (paesi anglosassoni ed Europa nord-occidentale) con prevalenza di HBsAg fra 0,2 e 0,5% e con prevalenza di anti-HBs fra il 4 e il 6%, dove l'infezione infantile è poco frequente; una seconda area (bacino del Mediterraneo,

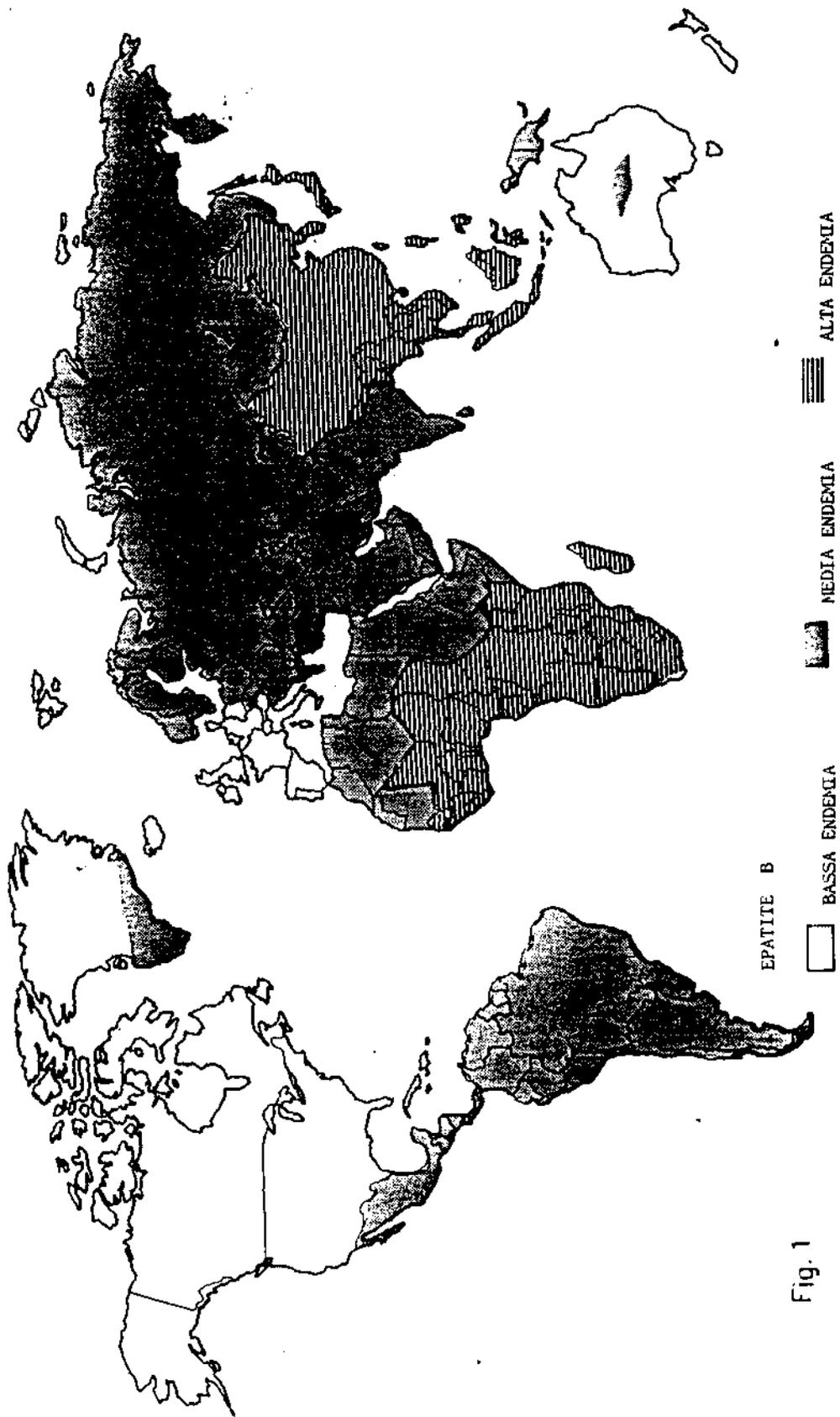


Fig. 1

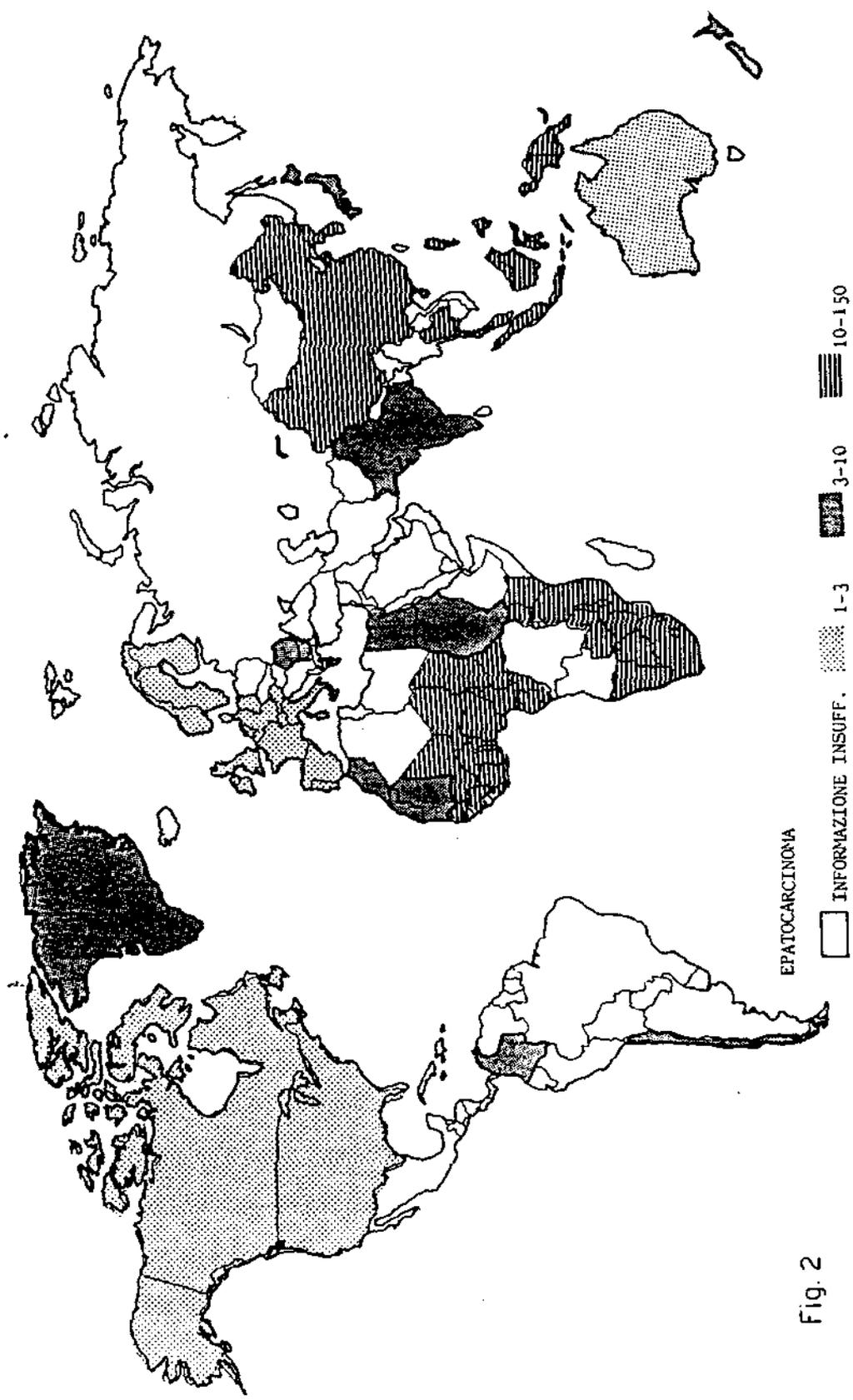


Fig. 2

Europa orientale, gran parte dell'Asia e dell'America Latina) con prevalenza di HBsAg fra il 2 e il 7% e di anti-HBs fra il 20 e il 55%, dove l'infezione infantile è frequente; una terza area (Africa subsahariana, sud-est asiatico) con prevalenza di HBsAg fra il 15 e il 20% e di anti-HBs fra il 70 e il 95%, dove l'infezione infantile è altamente frequente. Le aree geografiche a maggiore prevalenza di portatori cronici di HBsAg corrispondono alle aree a più elevata incidenza di epatocarcinoma (Fig. 2).

In Italia la prevalenza di HBsAg fra giovani maschi di 18-26 anni è stimata del 3,4%; nel sud e nelle isole la prevalenza è quasi doppia (4,3%) rispetto al centro-nord (2,3%) (5). Si calcola che nel nostro paese si trovino circa 2 milioni di portatori cronici con una grande variabilità fra le varie regioni: mentre infatti la prevalenza di portatori nel Trentino e in Val d'Aosta è abbastanza simile a quella dei paesi anglosassoni (oscillando intorno a 0,5%), essa può arrivare in alcune aree del sud ai valori riscontrabili in Senegal e a Taiwan (6).

La possibilità di diventare portatore cronico, una volta contratta l'epatite acuta, varia in maniera inversa all'età in cui è contratta l'infezione: mentre, infatti, per l'adulto oscilla fra il 5 e il 10%, per il bambino nei primi anni di vita è di circa il 50% e per il neonato anche del 90% (4, 7). La spiegazione dell'elevato numero di portatori cronici esistenti in alcune aree geografiche è pertanto da attribuire all'acquisizione precoce, nel corso della vita, dell'infezione, che si realizza attraverso due modalità: perinatale ed orizzontale tardiva.

La trasmissione perinatale si verifica allorché un neonato nasce da madre portatrice cronica di HBsAg. Sebbene l'HBV possa infettare il feto nell'utero, ciò avviene di rado ed al massimo nel 5% dei casi (8),

probabilmente dovuti a pervietà della placenta; la maggior parte delle infezioni si realizza al momento del parto, come conseguenza del passaggio di sangue materno nella circolazione del neonato o per accidentale inoculazione di sangue, oppure nelle prime settimane di vita in seguito all'instaurarsi di stretti rapporti di dipendenza madre-figlio (4, 8, 9). Il rischio di infezione è legato alla presenza nel siero della madre, oltre che dell'antigene HBsAg, anche dell'antigene HBeAg, che è una proteina solubile associata con il core del virus B e la cui presenza è un indice indiretto di replicazione virale. Se la madre è portatrice di entrambi questi antigeni la probabilità di trasmissione di HBV al neonato è in pratica del 100% e circa il 90% di tali neonati diverranno portatori cronici; di questi il 50% è destinato a morire di cirrosi e/o cancro del fegato nell'arco di alcuni anni, durante i quali l'infezione si può trasmettere a fratelli e compagni di gioco (7). Quando invece la madre portatrice di HBsAg presenta anche l'anticorpo anti-HBe oppure è priva del sistema HBeAg/anti-HBe, la probabilità di infettare il neonato è rispettivamente del 25 e del 12%; tali neonati, inoltre, diventano meno frequentemente portatori cronici di quelli nati da madre con l'antigene HBeAg (7). Pertanto, in aree geografiche quali Taiwan e Hong-Kong, ove la prevalenza di madri portatrici di HBsAg è del 15% e la proporzione fra esse di portatrici anche dell'antigene HBeAg è così alta da raggiungere frequenze del 40%, la modalità perinatale di trasmissione del virus è estremamente diffusa e costituisce la causa fondamentale dell'elevato numero di portatori esistenti (8, 9).

Per contro, ci sono zone come alcuni paesi africani quali Senegal, Sud-Africa e Gambia, dove, pur essendo la prevalenza di HBsAg nella

popolazione analoga a quella di Taiwan (15% circa), la proporzione di madri portatrici anche di HbeAg oscilla solo tra il 15 e il 3%; in queste zone l'infezione da HBV si realizza attraverso la modalità orizzontale tardiva, in quanto l'acquisizione dell'eventuale stato di portatore è, in genere, un fenomeno successivo al primo anno di vita (10-12). Il contagio, in questo caso, sarebbe legato, sia agli stretti contatti che si stabiliscono fra madre e figlio nel corso ulteriore della vita (9), sia soprattutto alla presenza in famiglia di un fratello più adulto portatore di HBsAg, contagiatosi a sua volta in precedenza dalla madre (11, 12). Quando, infatti, in una famiglia di questi paesi africani vi è un fratello più adulto portatore di HBsAg, la probabilità per un bambino di divenire a sua volta portatore è del 42,2%; se invece il portatore è la sola madre, la probabilità scende al 28,2% (12). Questo fenomeno è stato spiegato dal fatto che nelle madri portatrici, durante la gravidanza e il puerperio, la presenza dell'antigene HBeAg diminuisce rapidamente fin quasi a negativizzarsi e, pertanto, un fratello più adulto ha chiaramente avuto più probabilità di uno più giovane di essersi infettato durante il periodo perinatale dalla madre che, all'epoca della prima gravidanza, era ancora portatrice dell'antigene (9). La diffusione di HBV parte in effetti sempre da una madre portatrice che continua a contagiare i successivi figli, sia pure indirettamente, attraverso il primo figlio divenuto portatore (9).

Quando l'infezione è contratta dal bambino successivamente al primo anno di vita, le conseguenze, come già detto prima, sono meno drammatiche che se contratta nelle prime settimane di vita, in quanto la probabilità di cronicizzazione è circa il 50%, ma è comunque sempre più grave che se contratta in età adulta durante la quale la probabilità di

cronicizzazione oscilla soltanto fra il 5 e il 10%.

BIOLOGIA DEL VIRUS

Una delle più grosse difficoltà che si sono incontrate nello studio dell'HBV è che questo virus non può essere coltivato in vitro. Inoltre, non è possibile infettare nessun animale da laboratorio ad eccezione dello scimpanzé il cui costo tuttavia diventa spesso un elemento limitante per la ricerca. Alla fine degli anni '70, però, lo sviluppo dell'ingegneria genetica e delle tecniche di biologia molecolare, nonché la possibilità di utilizzare discrete quantità di virus animali molto simili all'HBV, hanno consentito di approfondire la conoscenza della biologia di questo virus.

Nel siero di pazienti infettati da HBV si ritrovano 3 tipi di particelle virali (13, 14):

- particelle sferiche dal diametro di 42 nm che costituiscono il virione completo; sono chiamate particelle di Dane dal suo scopritore;
- particelle subvirali sferiche di 22 nm;
- particelle subvirali a bastoncino aventi una lunghezza di 50-500 nm e un diametro di 22 nm.

Si calcola che su una particella di virione completo si trovino nel siero circa 1.000 particelle subvirali.

Solo la particella di Dane è infettante. Essa è costituita da un rivestimento esterno o "envelope" o "surface" di 7 nm sintetizzato nel citoplasma degli epatociti e da una parte centrale o nucleocapside o "core" di 27 nm (13) che è sintetizzata nel nucleo degli epatociti. All'interno del core si trovano un DNA circolare a doppia elica, costituito da circa 3.200 nucleotidi, un enzima ad attività

DNA-polimerasica, una fosfochinasi specifica (15, 16) e una DNA-linked protein. Una particella di Dane può essere rappresentata schematicamente dalla Fig. 3.

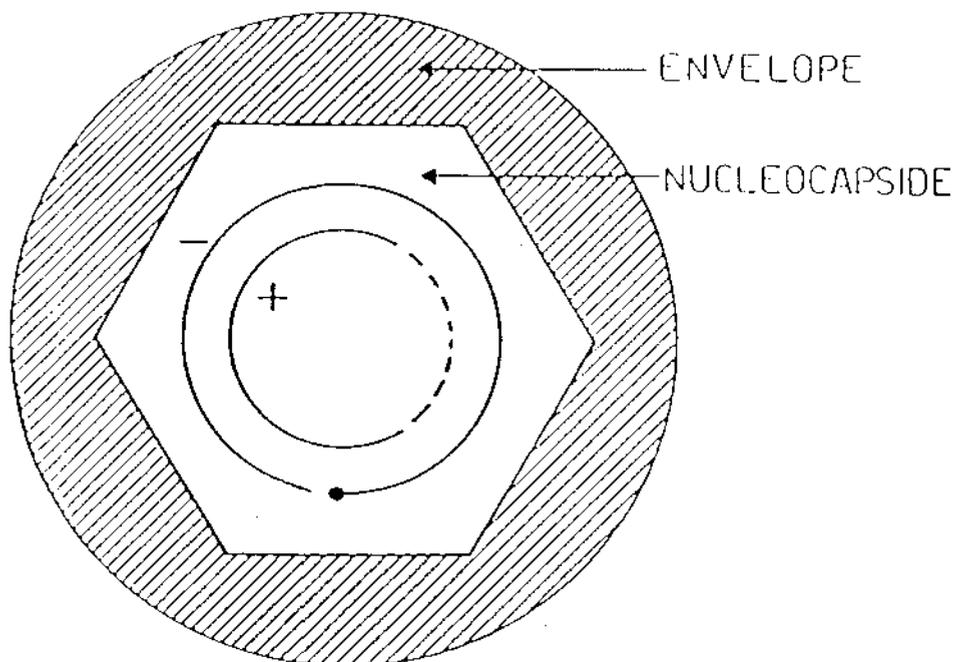


Fig. 3

L'antigene HBsAg

Le particelle virali sferiche e a bastoncino altro non sono che envelope sintetizzato in eccesso durante la formazione del virus. Le forme predominanti nelle persone infette sono le particelle subvirali allungate che si ritrovano nel siero in concentrazione fino a 100-200 $\mu\text{g/ml}$. L'envelope è un complesso lipoproteico (glicoproteine ancorate in un bilayer lipidico) che costituisce l'antigene di superficie del virus dell'epatite B: si abbrevia con la sigla HBsAg, dall'inglese Hepatitis B Surface Antigen. Nell'envelope sono state individuate tre strutture proteiche distinte: una a basso peso molecolare chiamata proteina maggiore perché è la più abbondante, una ad alto peso molecolare detta

proteina grande, ed infine una a peso molecolare medio detta proteina media (17, 18).

La proteina maggiore è una proteina di 226 aa (amminoacidi) ed esiste in due forme: glicosilata GP27^S (*) che presenta un complesso glicano legato all'azoto di Asn 146, e non glicosilata P24^S. La struttura primaria è costituita da tre sequenze idrofobiche (che probabilmente attraversano il bilayer lipidico) separate da due sequenze idrofiliche; la prima di queste si trova fra gli aa 24 e 79, la seconda fra 99 e 168.

La proteina grande si trova anch'essa in due forme: glicosilata GP42^S contenente un glicano, e non glicosilata P39^S (18). La sua lunghezza varia a seconda del tipo di variante antigenica: 389 aa nel caso di "y" e 400 aa nel caso di "d" (vedi appresso).

La proteina media è costituita da 281 aa e si trova in due forme ambedue glicosilate, GP33^S e GP36^S, che si differenziano solo per il grado di glicosilazione; la prima contiene un glicano, la seconda due. La proteina media presenta le proprietà di reagire con l'albumina (19) e ciò spiegherebbe, come si vedrà meglio in seguito, il meccanismo con cui gli epatociti capterebbero l'HBsAg e con esso il virus.

Nell'HBsAg del virione completo si trovano 300-400 molecole di proteina maggiore e 40-80 molecole fra proteina grande e proteina media (18); la stessa composizione è presente nelle particelle subvirali a bastoncino. La composizione, invece, delle subparticelle sferiche varia a seconda che il portatore cronico presenti o meno replicazione virale.

(*) La nomenclatura è quella concordata nel Cold Spring Harbor Meeting del 1985; il numero indica il PM espresso in migliaia di daltons.

Nel primo caso, mentre le quantità di proteina maggiore e media sono identiche a quelle del virione completo, la quantità della proteina grande è 20 volte minore. Nel caso invece di portatore con assenza di replicazione virale, la massa proteica è costituita, quasi esclusivamente, da proteina maggiore; la proteina media è inferiore all'1% e la proteina grande è assente.

L'HBsAg è stabile per anni anche a temperatura ambiente, ancora di più se congelato a -20°C .

L'HBsAg è un antigene conformazionale: l'unità strutturale che porta l'antigenicità è un dimerico con un ponte disolfuro (20); la riduzione del ponte $-S-S-$ comporta dissociazione del dimerico e drastica riduzione della capacità antigenica. Tale capacità persiste anche dopo riscaldamento a 60°C per 10 ore o a 98°C per 1'; scompare dopo un'ora a 85°C o dopo 5' a 100°C .

Esistono diverse varianti dell'antigene HBsAg: oltre ad un determinante antigenico comune "a", sono noti altri 4 determinanti: d, y, w, r, dove "d" è incompatibile con "y" e "w" con "r". Si possono avere quindi 4 sottotipi principali: adw, adr, ayw, ayr. Le varianti e i sottotipi si possono distinguere facilmente mediante tests immunologici: immunodiffusione, o immunoelettroforesi, o meglio ancora radio-immunoassay con anticorpi monoclonali specifici (19). La presenza, nel sangue di un soggetto, di una determinata variante antigenica o coppia di varianti spesso ci rivela la provenienza del soggetto stesso da una determinata area geografica: in altre parole, la variante antigenica rappresenta un marker di popolazione e, in alcuni casi, ci fornisce notizie sulle migrazioni, anche remote, dei popoli. Una colonia di tibetani, ad esempio, impiantatasi all'inizio degli anni 50 nei pressi

di Pechino e rimasta pressoché isolata, presenta la stessa variante y che si trova nel Tibet e che è totalmente assente nella zona di Pechino, dove invece è presente la variante d. La variante r è molto diffusa nella Cina settentrionale, come pure nel nord del Giappone (a tal proposito si ha notizia di un'invasione del Giappone settentrionale, avvenuta nel 5° secolo, da parte dei cinesi del nord); la variante w si ritrova nella Cina meridionale e nel Giappone del sud. Se tuttavia dividiamo il mondo in tre grandi aree geografiche, si osserva che in estremo oriente e nel sud-est asiatico il sottotipo ampiamente predominante è "adr", nell'area mediterranea ed in Africa prevale "ayr", in America e nell'Europa Settentrionale è diffuso "adw"; il sottotipo "ayr" è molto raro.

L'antigene HBcAg

Per trattamento della particella di Dane con detergente non ionico, quale ad esempio il Nonidet P40, l'HBsAg viene rimosso e si libera il nucleocapside interno o "core" (13) costituito da un solo polipeptide denominato antigene del "core" del virus e da una fosfochinasi specifica capace di fosforilare il polipeptide. L'antigene si abbrevia con la sigla HBcAg, dall'inglese Hepatitis B Core Antigen. Il polipeptide, chiamato P22^C perché ha un peso molecolare di 22.000, è costituito da 185 aa, molti dei quali sono arginina; la sequenza C-terminale, di circa 40 aa, ha una struttura protammino-simile (19, 21) ed è ritenuta responsabile del legame fra il "core" e il DNA virale. Essa infatti è molto ricca in arginina, serina, prolina e contiene almeno due sequenze octapeptidiche eguali Ser-Pro-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Glu. L'HBcAg non è solubile e non si può svelare nel sangue perché è racchiuso nella

particella di Dane. Si trova nel nucleo degli epatociti di soggetti cronici, raramente nei casi di epatite acuta.

L'anticorpo della classe IgM (anti-HBc IgM) compare nella fase iniziale dell'infezione ed è indice di moltiplicazione attiva del virus; esso può rappresentare, sia pure per pochi giorni, l'unico marker di infezione, quando è già scomparso l'HBsAg e non è ancora comparso l'anti-HBs. Un mese dopo l'apparizione dell'anti-HBc IgM, si forma l'anti HBc IgG che, pur persistendo a bassa concentrazione per mesi o anni, non fornisce informazione sull'infettività del soggetto.

L'antigene HBeAg

La capacità antigenica dell'HBcAg risiede nella struttura quaternaria del polipeptide. Quando questa viene distrutta, ad esempio per effetto di agenti dissocianti come SDS (sodio dodecilsolfato) o guanidina, l'antigenicità HBcAg si trasforma nell'antigenicità HBeAg; in altre parole, HBeAg altro non sarebbe che il P22^c del core privo ormai della struttura quaternaria e parzialmente idrolizzato ad una proteina di 15.000 daltons la cui sequenza C-terminale è costituita da Thr-Thr-Val-Val (22, 23). Questo antigene fu descritto per la prima volta nel 1972 (24), ha un coefficiente di sedimentazione 12 S e una densità di 1,29 in CsCl. La presenza di HBeAg denota attiva replicazione del virus: l'antigene circola nel sangue, libero o legato alle proteine del siero, per cui tutti i liquidi biologici diventano altamente infettanti. L'infettività di un siero contenente HBsAg e HBeAg è 10^7 volte superiore a quella di un siero HBsAg positivo HBeAg negativo.

L'HBeAg compare una settimana circa dopo l'HBsAg e scompare 2-3 settimane prima dell'antigene di superficie; poco dopo compare

l'anticorpo anti-HBe. Se invece persiste HBeAg, ciò significa quasi sempre che la malattia sta cronicizzando.

Organizzazione genetica dell'HBV

L'acido nucleico del virus può essere liberato dal nucleocapside per trattamento con SDS, digestione delle proteine con proteinasi K e successiva estrazione con fenolo-cloroformio (15, 25). Il genoma del virus dell'epatite B è il più piccolo che si conosca fra i virus animali a DNA ed ha un peso molecolare di $2,1 \times 10^6$ daltons. E' costituito da un DNA a doppia elica (di circa 3.200 paia di basi), di cui una intera o lunga (L) convenzionalmente detta -, e una incompleta o corta (S) detta +; la catena L ha una lunghezza costante di 3.182 nucleotidi, mentre la S ha una lunghezza variabile fra 1.700 e 3.182 basi; l'elica L presenta una interruzione o nick nei pressi dell'estremità 5' dell'elica corta (21, 26).

Come si può vedere dalla Fig. 4, le due catene sono appaiate alle loro estremità per una lunghezza di 225 nucleotidi circa (zona compresa fra 1.601 e 1.827); ciò garantisce la struttura circolare del genoma. All'estremità 5' di ambedue le catene si trova una identica sequenza di 11 paia di basi 5'-TTCACCTCTGC chiamata DR (Direct Repeat): DR1 per la catena L, DR2 per la catena S. La sequenza DR è stata trovata in tutti gli Hepadna virus (vedi appresso) e ciò fa pensare ad un suo preciso ruolo biologico.

Nel 1979 il genoma è stato clonato e sequenziato completamente (27). Sono stati così individuati almeno 4 geni principali S, C, P, X (21) che non sono contigui, ma si accavallano l'uno sull'altro per tratti brevi o lunghi. Un genoma con i geni accavallati determina la

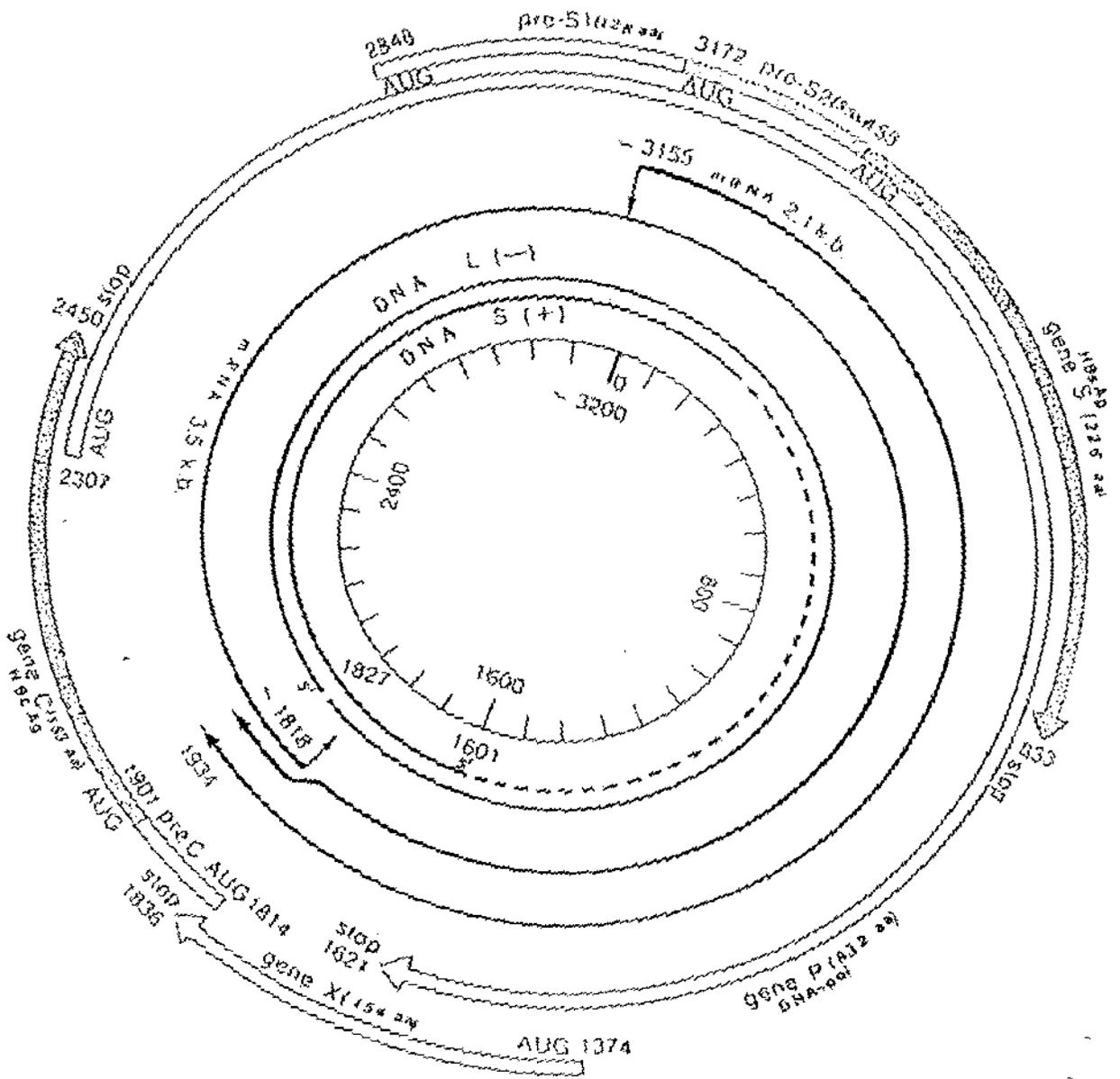


Fig. 4

sintesi di un numero di proteine maggiore di quello determinato da un genoma della stessa taglia ma con i geni contigui. Tale struttura, che si informa a principi di economia, si trova anche in altri virus.

Il gene S è responsabile della sintesi della proteina più abbondante dell'envelope, quella cioè che porta l'antigene HBsAg. Davanti al gene S, sono stati individuati due tratti pre-S₁ e pre-S₂ che intervengono nella sintesi delle altre due proteine dell'envelope (17, 18): la proteina grande (quella ad alto PM) è codificata da S, pre-S₁ e pre-S₂; la proteina media (quella a PM medio) da S e da pre-S₂. Le proprietà di quest'ultima proteina potrebbero spiegare il meccanismo con cui gli epatociti captano il virus. Essa, e più precisamente la sequenza idrofilica di 55 aa codificata da pre-S₂, ha la capacità di legarsi specificamente alle molecole di albumina polimerizzata che si trovano nel sangue; ma siccome la stessa affinità la presentano anche gli epatociti, questi capterebbero l'albumina legata alla proteina e, con essa, l'envelope e quindi il virus (28). La regione pre-S₂ codifica anche per una proteina di 18.000 daltons (17) che è localizzata sulla superficie del virione completo; essa presenta un alto potere antigenico tanto che molto probabilmente costituirà in un futuro molto vicino il componente fondamentale dei prossimi vaccini contro l'epatite B.

Il gene C codifica per la proteina del nucleocapside che porta l'antigene HBcAg; davanti al gene C, si trova una regione pre-C, la cui funzione non è ancora ben conosciuta.

Il gene P è il gene più lungo e codifica per una proteina ricca in istidina di circa 90.000 daltons avente funzione di DNA-polimerasi.

Il gene X, infine, codificherebbe per una proteina di circa 150 aa

che si trova nel fegato di alcuni soggetti infettati da HBV e di cui non si conosce ancora la funzione.

Recentemente, nel fegato di scimpanzé infettato da HBV, sono stati individuati due tipi di RNA messaggero poli A⁺, uno costituito da 2.100 nucleotidi, l'altro da 3.500 nucleotidi (29, 30). Sono ambedue trascritti dalla catena L. Il primo, che inizia da pre-S e termina in C, presiede alla traduzione della proteina maggiore dell'envelope. Il secondo, quello da 3.500 nucleotidi, desta qualche stupore, se non altro perché è più lungo del genoma del virus; è responsabile per la traduzione della proteina del core e forse della DNA-polimerasi, ma in teoria potrebbe tradurre anche altre proteine; tuttavia nulla si sa con certezza. Nel fegato, durante la replicazione virale, i due RNA sono presenti in quantità eguali; quando il genoma è integrato, l'RNA 2.100 è 10 volte superiore all'RNA 3.500 (31).

Altre specie minori di RNA sono state rivelate, ma non se ne conoscono i prodotti di traduzione.

Poche sono le informazioni riguardanti gli elementi regolatori che controllano la trascrizione dell'HBV. Per quanto concerne l'RNA 2.100 sembra che un promoter si trovi nella regione pre-S₁ alla posizione 3.122 (29). Non si conosce alcun promoter per l'RNA 3.500; si conosce invece un promoter tipo TATA in un RNA analogo di 3.700 nucleotidi (32) che si trova nel virus della marmotta e in quello dell'anatra.

HBV e gli altri Hepadna virus

RNA messaggeri analoghi a quelli descritti nel paragrafo precedente sono stati trovati in altri virus simili all'HBV. Nel virus dell'epatite dell'anatra o DHBV (Duck Hepatitis B Virus), in quello dell'epatite

della marmotta o WHV (Woodchuck Hepatitis Virus) e in quello dello scoiattolo o GSHV (Ground Squirrel Hepatitis Virus) sono stati trovati due RNA, uno da 2.100 ed uno da 3.700 nucleotidi (32). Questi virus, insieme all'HBV, costituiscono il gruppo degli Hepadna virus, che sono virus epatotropi che provocano infezione virale persistente. Solo HBV e WHV possono provocare anche epatite cronica attiva.

La marmotta, infatti, presenta forme di epatopatie simili a quelle che si ritrovano nell'uomo; in essa è stata osservata una stretta correlazione fra l'epatocarcinoma e l'epatite cronica; però, mentre nell'uomo il cancro si sviluppa quasi sempre su un fegato cirrotico, la cirrosi sembra che nella marmotta non esista.

Nell'anatra di Pechino e nello scoiattolo, l'infezione virale non comporta lesioni del fegato; fra questi animali, si conoscono solo portatori cronici sani; si valuta che in Cina il 40% delle anatre siano portatrici croniche.

I genomi dei tre virus animali (DHBV, WHV, GSHV) sono stati clonati e sequenziati: risultano molto simili all'HBV. Anche le loro particelle virali sono analoghe a quelle dell'HBV. I genomi di WHV e GSHV sono costituiti da 3.300 bp (paia di basi) (33), quello di DHBV da 3.000 bp (34). Rispetto all'HBV, l'omologia nucleotidica di WHV, GSHV e di HBV è rispettivamente del 70%, 55% e 40% circa. WHV e GSHV differiscono da HBV nella regione pre-S₁; DHBV manca del gene X. Gli antigeni dell'envelope e del core che si trovano nella marmotta e nello scoiattolo sono simili all'HBsAg e all'HBcAg; quelli dell'anatra sembrano diversi.

Ciclo di replicazione degli Hepadna virus

L'anatra di Pechino è un modello animale particolarmente prezioso perché le uova e i piccoli delle anatre portatrici contengono il virus; essa infatti è stata utilizzata in molti esperimenti tesi a comprendere il meccanismo di replicazione virale. Nel 1982 Summers e Mason (35) hanno proposto il meccanismo schematizzato in Fig. 5, che può essere estrapolato anche agli altri Hepadna virus, data la loro grande somiglianza. Successivamente (36) il meccanismo di replicazione proposto è stato confermato anche per l'HBV. Il virus viene captato dalla cellula epatica (Fig. 5.1) e, nell'attraversare il citoplasma, si libera dell'envelope prima (Fig. 5.2), e del nucleocapside poi (Fig. 5.3). Nel nucleo, la struttura circolare del genoma si apre, si trasforma in DNA supercoiled (Fig. 5.4) e, per azione di una RNA-polimerasi della cellula ospite, viene copiato in RNA (Fig. 5.5): si formano così gli RNA messaggeri che permettono la sintesi della DNA-polimerasi, della DNA-linked protein e di tutte le altre proteine virali. Le proteine del capsido vanno ad avvolgere la DNA-polimerasi, l'RNA e la DNA-linked protein; questo insieme esce dal nucleo (Fig. 5.6) e va nel citoplasma. È a questo punto che la DNA-polimerasi virale comincia ad agire sull'RNA copiandolo in DNA; l'RNA è un vero e proprio pregenoma e l'enzima agisce come una vera e propria trascrittasi inversa. La DNA-linked protein è legata all'estremità 5' e agirebbe come promoter per la sintesi della catena L. Man mano che si sintetizza il DNA, l'RNA viene distrutto per effetto di un'attività RNasica. La DNA-polimerasi forma interamente la catena L di 3.182 nucleotidi (Fig. 5.7) e parzialmente la catena S (Fig. 5.8). L'azione dell'enzima infatti termina quando il capsido si ricopre dell'envelope, consentendo così

alla nuova particella virale di uscire dalla cellula epatica (Fig. 5.9) e di iniziare un altro ciclo. Il tempo che intercorre fra l'uscita dal nucleo e l'uscita dalla cellula è variabile: è per questo motivo che la DNA-polimerasi virale copia in alcuni casi un tratto più corto della catena S, in altri un tratto più lungo.

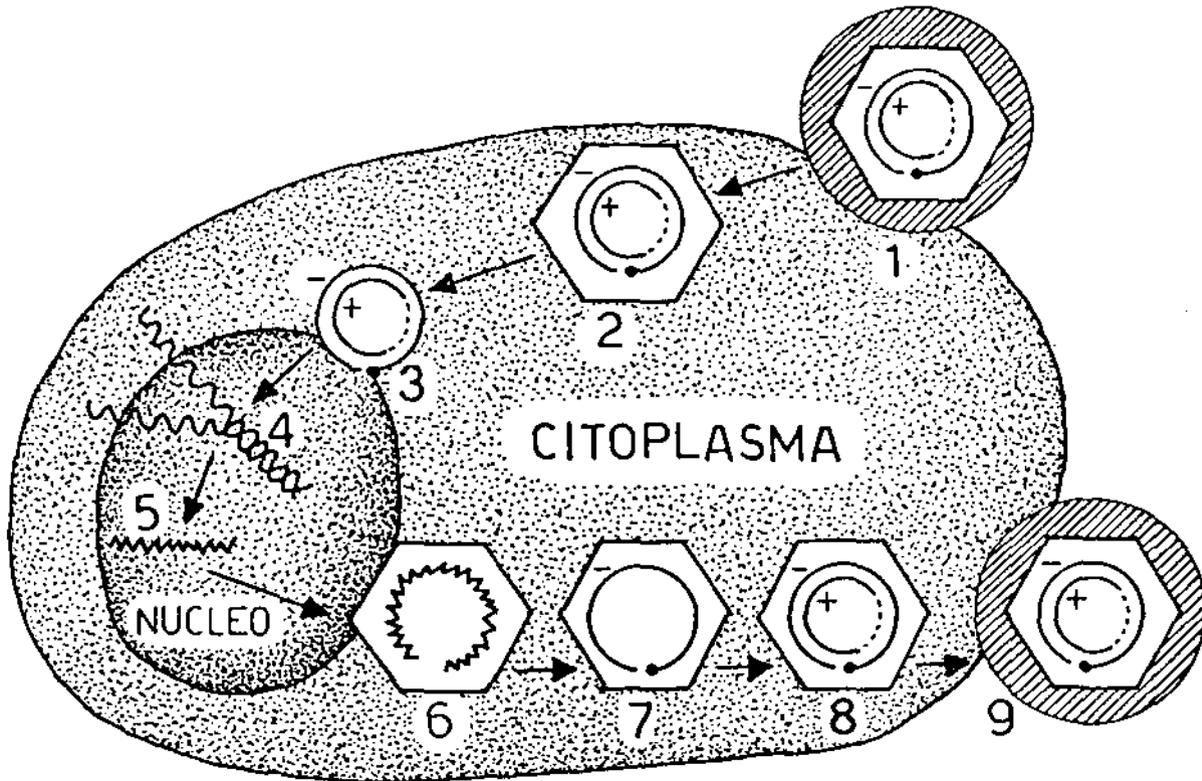


Fig. 5

Il meccanismo di replicazione degli Hepadna virus è molto diverso da quello degli altri DNA-virus; in questi il genoma viene ricopiato direttamente in DNA per azione di una DNA-polimerasi; gli Hepadna virus, invece, prima di sintetizzare il DNA debbono passare per uno stadio intermedio, il pregenoma a RNA. Il meccanismo è molto simile a quello che si riscontra nei retrovirus che sono virus a RNA: essi, per replicare, hanno bisogno di un pregenoma intermedio che è una molecola

di DNA; questa, per azione di una trascrittasi inversa, viene copiata nell'RNA del genoma virale.

Le similitudini tra i due tipi di virus non finiscono qui. Ambedue infettano cronicamente le cellule senza distruggerle; ambedue hanno un ruolo cancerogeno. Infine, i geni C, P, S degli Hepadna virus hanno funzioni analoghe a quelle svolte dai geni Gag, Pol, Env nei retrovirus. C e Gag presiedono alla sintesi delle proteine del nucleocapside. S ed Env comandano la formazione delle proteine dell'envelope. P determina la sintesi della DNA-polimerasi negli Hepadna virus e Pol della trascrittasi inversa nei retrovirus; la similitudine di questi due enzimi non risiede solo nella funzione (di trascrittasi inversa) ma anche nella struttura: in entrambe sono state individuate numerose sequenze amminoacidiche uguali (37).

PATTERNS SIEROLOGICI DELL'INFEZIONE

L'HBV è uno dei virus più diffusi nel mondo e milioni di persone ne vengono colpite ogni anno. Esso può infettare un soggetto senza che questi presenti alcun sintomo oppure provocare vari tipi di patologie.

La patologia più comune è l'epatite virale acuta: gli epatociti infettati dal virus vanno in necrosi provocando la classica sintomatologia dell'epatite. Poiché l'HBV non è un virus direttamente citopatico, l'entità della necrosi non è proporzionale soltanto al numero di cellule infette ma anche e soprattutto al grado di risposta immunitaria dell'ospite. L'antigene HBcAg va sulla membrana dell'epatocita e, attraendo i linfociti T, costituisce il bersaglio del sistema immune (il virus reagisce all'azione immunitaria liberando una grande quantità di antigene HBeAg che, attraendo anch'esso i linfociti, li distrae dall'attacco all'HBcAg). In alcuni casi, la risposta immunitaria è così forte che i linfociti T sono in grado di distruggere contemporaneamente tutte o quasi tutte le cellule epatiche provocando così l'epatite fulminante; fortunatamente questi casi sono rarissimi (circa 0,1%). L'epatite virale acuta B si caratterizza per la presenza nel siero dell'antigene di superficie del virus HBsAg. Il quadro sierologico dell'epatite acuta B è rappresentato dalla Fig. 6A. L'HBsAg appare, nella maggioranza dei casi (75-85%) a distanza di 40-60 giorni - talvolta anche di 3-6 mesi - dall'ingresso del virus nell'organismo. Tuttavia, in una recente rassegna, Krugman e collaboratori, utilizzando la metodica radioimmunologica, stimarono il periodo di incubazione, dal momento dell'esposizione parenterale, in sei giorni appena (38). Successivamente, si alza il livello ematico delle transaminasi e appare

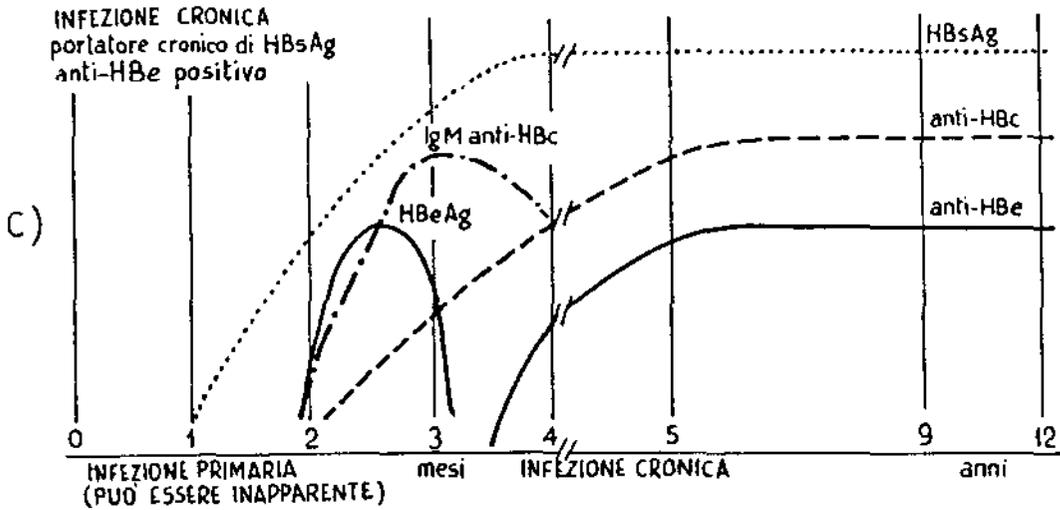
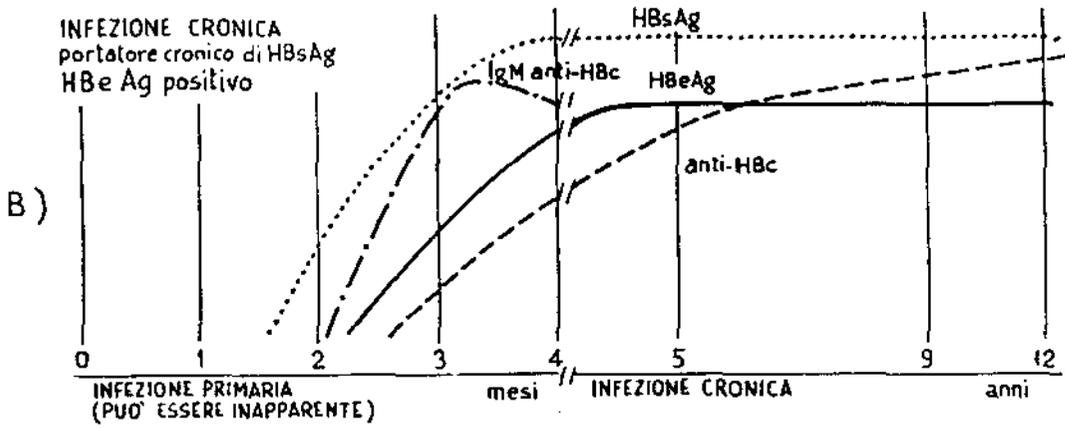
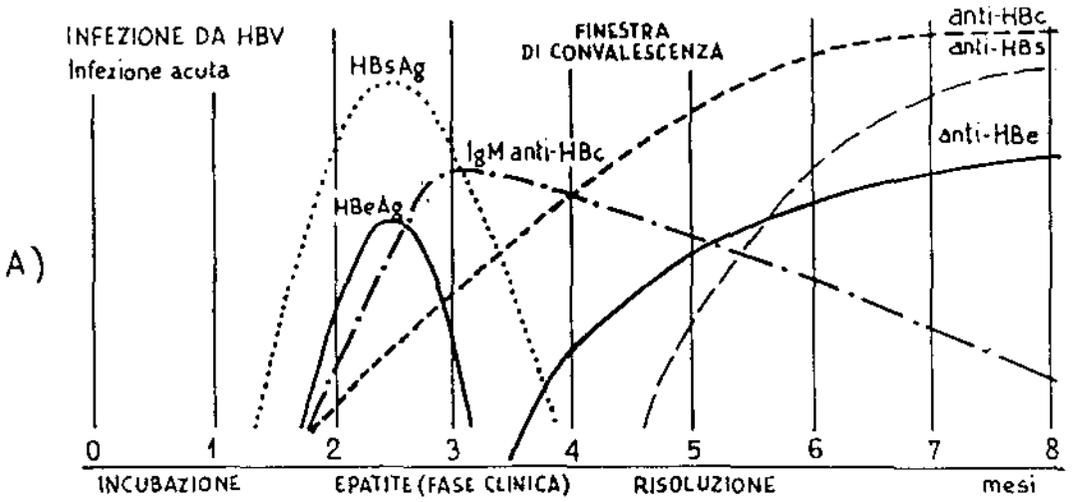


Fig. 6

la sintomatologia clinica. In questa fase cominciano a rivelarsi nel siero l'antigene HBeAg che sta ad indicare replicazione attiva del virus e quindi stato altamente infettivo, e l'anticorpo anti-HBc che, come abbiamo già visto, rappresenta il primo indice di risposta immunitaria da parte dell'organismo. L'HBeAg rimane in circolo 40-60 giorni e dopo poco tempo appare l'anticorpo anti-HBe. Verso la fine del quarto mese scompare anche l'antigene HBsAg. Ciò significa che sta iniziando il processo di guarigione, cioè il processo di eliminazione (clearance) dall'organismo delle cellule infettate dal virus. Tuttavia, il segno sicuro di guarigione completa e di duratura immunità è la presenza nel siero dell'anticorpo anti-HBs che però compare molti giorni, talvolta alcuni mesi, dopo la scomparsa di HBsAg. In questa fase di contemporanea assenza dell'antigene di superficie e del suo anticorpo chiamata "periodo finestra" (window period), l'unico indice di infezione è l'anti-HBc; questo marker, se di classe IgM, denota infezione recente ancora in atto, se di classe IgG indica infezione pregressa. Quando comunque l'anticorpo anti-core si trova associato all'anticorpo anti-HBs, questo status indica infezione pregressa da cui il soggetto è completamente guarito.

La persistenza di HBsAg nel siero per più di sei mesi denota, come già detto, condizione di portatore cronico. Tale condizione è indipendente dall'eventuale sieroconversione HBeAg/anti-HBe (Figg. 6B e 6C) ed è comunque caratterizzata dall'assenza dell'anticorpo anti-HBs.

PARAMETRI DI INFETTIVITA'

Nell'ambito dei portatori cronici è necessario distinguere i soggetti sani da quelli malati e, fra questi, i soggetti scarsamente infettivi da quelli altamente infettivi.

La maggioranza dei portatori cronici è fortunatamente costituita da soggetti asintomatici, senza segni clinici o biochimici di sofferenza epatica e con fegato istologicamente normale; altri portatori però, anche in assenza di sintomi soggettivi di malattia, possono presentare alla biopsia epatica un'epatite cronica e/o essere molto infettivi. Riveste quindi notevole importanza poter individuare, attraverso precisi parametri bioumorali, quali siano i portatori realmente infettanti, sia per una campagna vaccinale allargata ai conviventi dei soggetti portatori cronici, sia per l'adozione di eventuali interventi di sanità pubblica.

Particolare attenzione è stata riservata fin dalla sua scoperta (24) all'antigene HBeAg. La sua prevalenza nel siero dei portatori cronici è risultata variare considerevolmente in funzione delle caratteristiche dei pazienti studiati (39), della loro origine geografica (40) e della sensibilità della metodica impiegata (41). L'HBeAg è stato - e per alcuni versi è tuttora - considerato un marker, sia pure indiretto, dello stato di infettività di un soggetto portatore cronico di HBsAg (7, 42, 43). Per contro, la presenza dell'anticorpo anti-HBe era stata in molte situazioni pratiche considerata indice di limitata o assente infettività (42) di tali soggetti. Successivamente, vi è stata evidenza, sia sperimentale (44, 45) che clinica (7, 46), dell'infettività del soggetto HBsAg positivo con presenza dell'anticorpo

anti-HBe.

Il fatto che l'antigene HBeAg sia un parametro solo indiretto della presenza del virus B e che una certa quota di soggetti con l'anticorpo anti-HBe sia comunque infettante, comporta che la valutazione dello stato di infettività di un soggetto portatore cronico, basata sul sistema HBeAg/anti-HBe, non è attendibile, provocando talvolta un mancato riconoscimento dell'infettività in alcuni di tali soggetti.

La ricerca quindi di HBeAg e di anti-HBe nel siero fornisce risposte equivocate e può quindi essere utilizzata solo per una valutazione generica del grado di infettività. La determinazione dell'attività della DNA-polimerasi, enzima che si rivela solo in presenza di particelle virali complete, potrebbe rappresentare una misura di infettività, o meglio di replicazione virale, meno indiretta di quanto non sia la ricerca di HBeAg (43). Ma non vi è dubbio che la misura più diretta della replicazione virale, e quindi della potenziale infettività, non può che essere la determinazione del DNA virale o HBV DNA (25, 47-50).

Dalle numerose informazioni fornite dalla letteratura si ricava che i portatori cronici HBeAg positivi sono, nella quasi totalità, positivi anche per l'HBV DNA (50-52); i portatori HBeAg negativi, invece, rivelano presenza di DNA virale con frequenze molto variabili (52-54).

Fra i portatori cronici, i soggetti HBeAg negativi sono largamente predominanti (90-95%) nel nostro paese. Essi rappresentano una grande fonte di infezione ed hanno alte probabilità di evolvere in epatite cronica. In uno studio recente è stato trovato che il 15% degli anti-HBe positivi italiani risulta positivo anche per l'HBV DNA (55). Il DNA virale si ritrova in tutti i soggetti anti-HBe positivi che presentano

episodi di riattivazione dell'infezione virale o positività alternata per HBeAg o anti-HBe nel corso della storia naturale della loro malattia. Si tratta del fenomeno dell'intermittenza, già descritto da vari autori (55-57), che può trovare una spiegazione nel fatto che la maggior parte dei portatori di epatite cronica presenta un'infezione mista, cioè ora un'infezione attiva con cellule contenenti HBV in replicazione attiva appunto, ora un'infezione latente con cellule contenenti DNA virale integrato (56).

Nell'infezione virale attiva, il virus esprime completamente i suoi geni e sintetizza i relativi antigeni, HBeAg compreso; in seguito, per azione del sistema immunitario dell'organismo, si formano gli anticorpi, anti-HBe compreso, che in teoria dovrebbe denotare guarigione. Tuttavia, il portatore di infezione attiva può diventare portatore di infezione latente: l'HBV DNA, per ragioni ancora non note, si integra nei cromosomi della cellula ospite e i geni virali (ad eccezione di S che continua a sintetizzare l'HBsAg) non vengono espressi, la cellula sfugge all'azione del sistema immunitario e il soggetto diventa portatore di infezione latente; questo status è considerato scarsamente infettivo perché produce HBsAg solo sotto forma di particelle subvirali incomplete e quindi non infettive. Ad un certo punto si può verificare che il virus ricominci a replicare ritornando così all'infezione virale attiva. Solo quando l'infezione rimane latente per un periodo abbastanza lungo (4-8 anni), si può escludere con sufficiente certezza una ripresa della replica virale e il genoma del virus rimane indefinitamente integrato nella cellula. In tutti gli altri casi, un portatore cronico può presentare ora l'infezione attiva, ora quella latente.

Pertanto si può concludere che la ricerca del sistema

HBeAg/anti-HBe, fino a qualche anno fa ritenuta lo strumento più idoneo per valutare la replicazione virale, debba essere considerata non più completamente attendibile e quindi essere sostituita da altre metodiche. E' opinione ormai diffusa che il metodo più rigoroso è attualmente rappresentato dalla determinazione del DNA virale, in quanto indice diretto della replicazione.

DETERMINAZIONE DELL'HBV DNA NEL SIERO

Principio del metodo

L'HBV DNA si determina mediante il metodo della spot-ibridazione che si basa sulla denaturazione del DNA virale e sull'immobilizzazione su filtro di nitrocellulosa della singola elica. Questa viene poi ibridata con un probe che altro non è che il genoma completo dell'HBV inserito in un plasmide e marcato con ^{32}P . I campioni contenenti DNA virale, che quando denaturato è in grado di ibridarsi con il probe, si rivelano per mezzo dell'autoradiografia; dall'intensità degli spots radioattivi mediante densitometria si può arrivare anche ad una determinazione quantitativa dell'HBV DNA presente nel campione.

Preparazione e denaturazione del campione

I sieri possono essere conservati a -20°C anche per anni.

Il campione viene preparato secondo la procedura di Kam e collaboratori (25). 200 μl di siero vengono incubati in una provetta eppendorff a 37°C per 4 ore con 250 μl di TEN (Tris.HCl 10 mM pH 8; EDTA 10 mM; NaCl 150 mM) contenenti 2% di SDS (sodio dodecilsolfato), 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di DNA (di sperma di salmone o di timo di vitello) e 2 mg/ml di proteinasi K. (La stessa tecnica può essere adottata anche se il campione è costituito da tessuto epatico ottenuto per biopsia: 5-20 mg di tessuto si omogeneizzano con 450 μl di TEN contenenti SDS 1% e proteinasi K 1 mg/ml, e si lasciano incubare a 37°C per una notte). La miscela, dopo incubazione, viene estratta con 500 μl di fenolo saturato con TEN; si agita delicatamente e si centrifuga. La fase superiore si tratta con 500 μl di fenolo e di 500 μl di una miscela di cloroformio-

alcool isoamilico nel rapporto 24:1 (v/v); si agita e si centrifuga. La fase superiore viene trattata con 1/10 del volume di acetato sodico 3M e con due volumi di etanolo assoluto freddo. Dopo una notte a -20°C e centrifugazione, il pellet si lava con etanolo al 70%, si secca in essiccatore sotto vuoto ed infine si scioglie in 20 μl di TE (Tris.HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM).

2-5 μl di questa soluzione vengono deposti su filtro di nitrocellulosa (Schleicher e Schüll BA 85) e asciugati all'aria. Il filtro asciutto si immerge per 30 secondi in una soluzione di NaOH 0,1 M contenenti NaCl 1 M allo scopo di denaturare il DNA, cioè di separare le due catene della doppia elica. Si procede quindi alla neutralizzazione immergendo il filtro per 60 secondi in Tris 0,1 M (pH 7,2) contenente NaCl 1 M e lavandolo successivamente con acqua. Alla fine il filtro viene asciugato a 37°C e quindi messo in stufa a 80°C per 2 ore.

Recentemente questo metodo è stato sostituito da un altro più semplice (51) che ha il doppio vantaggio di essere più rapido e di evitare perdite di DNA virale. Esso consiste nell'utilizzare il siero tal quale senza procedere all'estrazione del DNA. Il metodo necessita di un semplice dispositivo costituito da una scatola di perspex munita di un portagomme a cui si possa applicare una pompa da vuoto; il piano superiore della scatola presenta dei fori dal diametro di 5-6 mm e distanti circa 2,5 cm l'uno dall'altro. Su questo piano viene posto con cautela il filtro di nitrocellulosa previamente imbibito con SSC 6X (SSC 1X è una soluzione contenente citrato bisodico 0,015 M e cloruro sodico 0,15 M); applicando un leggero vuoto, il filtro aderisce al piano lasciando intravedere le sagome dei fori.

Il campione si prepara mescolando 20-50 μl di siero con un eguale

volume di NaCl 2 M e con due volumi di NaOH 1 M; dopo incubazione a temperatura ambiente per 10-30 minuti onde permettere la denaturazione del DNA, la miscela di ogni campione viene depositata sul filtro in corrispondenza dei fori e lasciata filtrare sotto un leggero vuoto; successivamente si procede alla neutralizzazione facendo passare attraverso ogni foro 100-200 μ l di Tris 0,5 M (pH 7,4) contenente NaCl 3 M. Il filtro viene rimosso con delicatezza dalla scatola, posto fra due fogli di carta da filtro e riscaldato ad 80°C per due ore.

Ibridazione e autoradiografia

Per l'ibridazione si procede sostanzialmente secondo il metodo di Weller e collaboratori (50).

Il filtro viene messo in un sacchetto di plastica con 50 ml di tampone di pre-ibridazione; il sacchetto viene chiuso ermeticamente mediante saldatura a caldo e posto a 70°C per un'ora. Il tampone di pre-ibridazione è una soluzione contenente 2 mg/ml di ciascuno dei seguenti componenti: Ficoll 400, polivinilpirrolidone 360 (PVP), albumina di siero bovino (BSA) e sodio dodecilsolfato (SDS).

Il filtro viene asciugato a 37°C e messo in un altro sacchetto di plastica ad incubare per 50-60 ore a 42°C insieme a 50 ml di tampone di ibridazione così costituito:

Ficoll	0,5	mg/ml
PVP	"	"
BSA	"	"
SDS	"	"
formammide	deionizzata	50%
SSC	5X	

probe radioattivo $2-5 \times 10^8$ dpm totali (vedi appresso).

Prima dell'aggiunta del probe, il tampone di ibridazione viene riscaldato all'ebollizione per 3 minuti e, dopo raffreddamento, filtrato su millipore 0,45 nm.

La radioattività non incorporata viene rimossa immergendo il filtro nelle seguenti soluzioni di lavaggio:

- a) 50 ml di SSC 5X, SDS 0,1% e formammide 50% a 42°C per 30 minuti (due volte);
- b) 100 ml di SSC 2X e SDS 0,1% a 65°C per 30 minuti (3 volte).

Il filtro viene infine asciugato perfettamente a 37°C e quindi sottoposto ad autoradiografia per 48 ore a -70°C in una cassetta contenente una lastra Kodak X Omat G e uno schermato di intensificazione Dupont Cronex Lightning Plus. Dopo lo sviluppo della lastra, i campioni positivi appaiono come macchie (spots) nere, la cui intensità e ampiezza sono proporzionali alla quantità di HBV DNA contenuto nel campione in esame. Mediante un densitometro tipo Joyce-Loebel Chromosan 200/201, l'intensità di ogni spot viene misurata come densità ottica; dal valore dell'area dei picchi, rapportato a quello di sieri standard a titolo noto, si può ricavare la quantità di HBV DNA contenuta in ciascun campione positivo.

Il metodo è molto sensibile e può rivelare fino a 0,1 pg di HBV DNA; la sensibilità può diventare più alta fino a 0,01 pg, quando si usino pellicole più sensibili e si prolunghi il tempo di esposizione della lastra (in questo modo tuttavia c'è il rischio di ottenere spots meno nitidi e di avere un fondo più scuro). Considerando il peso molecolare dell'HBV DNA uguale a circa 2×10^6 daltons, 0,01 pg di DNA

virale corrispondono a circa 3.000 genomi completi, cioè a 3.500-4.000 particelle di Dane (51).

Il metodo è altamente specifico ed è dimostrato che la presenza di RNA non interferisce (49).

Generalmente, il DNA virale, quando è presente nel siero si trova in rapporto ponderale uguale a circa 1:1000 rispetto alla quantità di HBsAg (49).

Preparazione del probe radioattivo

Il DNA di un plasmide contenente il genoma dell'HBV inserito nel sito di restrizione Eco RI del plasmide pPR 322 viene purificato e marcato con il ^{32}P mediante il metodo della nick-translation (58). A grandi linee, il metodo si basa sul fatto che l'enzima DNasi interrompe la sequenza nucleotidica del DNA in più punti formando nei nicks o interruzioni e provocando il distacco di alcuni nucleotidi dalla doppia elica. Successivamente il preparato viene incubato con una DNA-polimerasi in presenza di nucleotidi radioattivi che vanno ad inserirsi nei nicks; in tal modo il DNA, ricostruito completamente, diventa radioattivo (probe).

Sperimentalmente si opera nel seguente modo. In un volume di 50 μl si mescolano nell'ordine:

1 nmole di ciascuno dei tre desossiribonucleotidi d-ATP, d-CTP, d-GTP non marcati;

1 μg di DNA plasmidico

5 μl di tampone costituito da Tris 0,5 M (pH 7,2), solfato di magnesio 0,1 M, ditiotreitolo 1 mM e BSA 0,5 mg/ml

125 μCi (125 μl) di $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ timidina-5'-trifosfato avente

un'attività specifica non inferiore a 3.000 Ci/mmol

25 pg di DNasi I di pancreas bovino (2.000 u/mg)

10 unità di DNA-polimerasi di E. Coli priva di endonucleasi.

Dopo incubazione a 15°C per 90-100 minuti, la reazione viene bloccata con 10 µl di EDTA 0,1 M. La miscela si percola attraverso una colonna (11 x 0,6 cm) di sephadex G-50 previamente equilibrata con tampone TES (Tris 10 mM pH 8; EDTA 5 mM; SDS 0,1%). Si eluisce con lo stesso tampone TES raccogliendo frazioni di volume non superiore a 500 µl: si ottengono due picchi di radioattività, il primo costituito da HBV DNA, il secondo dai nucleotidi non incorporati. L'attività specifica del primo picco varia da 2 a 5 x 10⁸ dpm/µg. Il probe dell'HBV DNA, prima di essere aggiunto al tampone di ibridazione, si mescola con 0,5 mg di DNA di sperma di salmone sciolto in SSC 5X, si fa bollire per 5 minuti e quindi si raffredda subito in ghiaccio.

CONCLUSIONI

La ricerca del DNA del virus B con la spot-ibridazione è un metodo che fornisce precise informazioni sull'evoluzione dell'infezione e sull'identificazione dei portatori cronici di HBsAg altamente infettanti.

Molteplici implicazioni scaturiscono sia sul piano clinico che su quello di sanità pubblica.

Sul piano clinico, la determinazione dell'HBV DNA costituisce indubbiamente il metodo più sensibile, non solo per una più corretta indicazione diagnostica, ma anche per una più sicura valutazione degli effetti della terapia anti-virale con adenina-arabinoside (59) o interferon (60) sulla possibilità di clearance (eliminazione) delle particelle infettanti di HBV dal sangue di soggetti affetti da epatite cronica B.

Sul piano di sanità pubblica, l'identificazione dei portatori cronici altamente infettanti consente di decidere come attuare una adeguata campagna vaccinale anti-epatite B (somministrando, ad esempio, il vaccino ai soli conviventi di tali soggetti), e quali eventuali cautele adottare nei luoghi di lavoro (applicandole, ad esempio, ai soli portatori cronici con presenza di HBV DNA nel siero).

Inoltre poiché è stato evidenziato (61) che nelle epatiti B acute autolimitantisi il tempo di clearance del DNA virale dal sangue è di poche settimane e al massimo di 42 giorni dall'inizio della sintomatologia clinica e comunque antecedente sia alla clearance dell'HBeAg che dell'HBsAg, l'assenza dell'HBV DNA costituisce una evidenza precisa e precoce della perdita della infettività in tali

soggetti. In tal modo si potrebbero ridurre i lunghi ed inutili periodi contumaciali a cui vengono sovente sottoposti i soggetti affetti da epatite B acuta.

BIBLIOGRAFIA

1. Beasley R.P. et al., *Hepatology* 2: 21-26 (1982)
2. Maupas P. et al., *Prog. Med. Virol.* 27: 1-5 (1981)
3. Beasley R.P. et al., *Lancet* 2: 1129-1133 (1981)
4. Denhardt F. & Gust I.D., *Bull. W.H.O.* 60: 661-691 (1982)
5. Pasquini P. et al., *Am. J. Epidem.* 118: 699-709 (1983)
6. Piazza M., *Epatite Virale*, Libreria Scientifica, Milano (1983)
7. Stevens C.E. et al., *J. Med. Virol.* 3: 237-241 (1979)
8. Beasley R.P. et al., *Lancet* 2: 1099-1102 (1983)
9. Beasley R.P. & Hwang L.V., *J. Infect. Dis.* 147: 185-190 (1983)
10. Barin F. et al., *Prog. Med. Virol.* 27: 148-167 (1981)
11. Botha J.F. et al., *Lancet* 1: 1210-1212 (1984)
12. Whittle H.C. et al., *Lancet* 2: 1203-1206 (1983)
13. Dane D.S. et al., *Lancet* 1: 695-698 (1970)
14. Gerin J.L. et al., *Am. J. Pathol.* 81: 651-661 (1975)
15. Kaplan P.M. et al., *J. Virol.* 12: 995-1005 (1973)
16. Robinson W.S. & Greenman R.L., *J. Virol.* 13: 1231-1236 (1974)
17. Stibbe W. & Gerlich W.H., *J. Virol.* 46: 626-628 (1983)
18. Heerman K.H. et al., *J. Virol.* 52: 396-402 (1984)
19. Gerin J.L. & Shih J.W.K., in *Viral hepatitis*, Vyas G.N. et al. eds., The Franklin Institute Press, p. 147 (1978)
20. Mishiro S. et al., *J. Immunol.* 124: 1589-1593 (1980)
21. Tiollais P. et al., *Nature* 317: 489-495 (1985)
22. Otori H. et al., *Intervirology* 13: 74-82 (1980)
23. Takahashi K. et al., *J. Immunol.* 122: 275-279 (1979)
24. Magnus L.O. & Espmark J.A., *J. Med. Virol.* 5: 323-330 (1972)

25. Kam W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 7522-7526 (1982)
26. Tiollais P. & Dejean A., La Recherche 16: 1324-1333 (1985)
27. Galibert F. et al., Nature 281: 646-650 (1979)
28. Machida A. et al., Gastroenterology 86: 910-918 (1984)
29. Cattaneo R. et al., Nature 305: 336-338 (1983)
30. Cattaneo R. et al., EMBO J. 3: 2191-2196 (1984)
31. Pourcel C. et al., J. Virol. 42: 100-105 (1982)
32. Möröy T. et al., EMBO J. 4: 1507-1514 (1985)
33. Seeger C. et al., J. Virol. 51: 367-375 (1984)
34. Mandart E. et al., J. Virol. 49: 782-792 (1984)
35. Summers J. & Mason W.S., Cell 29: 403-415 (1982)
36. Fowler M.J.F. et al., J. Med. Virol. 13: 83-91 (1984)
37. Toh H. et al., Nature 305: 827-829 (1983)
38. Krugman S. et al., N. Engl. J. Med. 300: 101-106 (1979)
39. Nielsen J.O. et al., Lancet 2: 913-915 (1974)
40. Aldershvile J. et al., J. Infect. Dis. 142: 18-22 (1980)
41. Lofgren B. et al., J. Med. Virol. 5: 323-330 (1980)
42. Okada K. et al., N. Engl. J. Med. 294: 746-749 (1976)
43. Alter H.J. et al., N. Engl. J. Med. 295: 909-913 (1976)
44. Berquist K.R. et al., Lancet 1: 1026-1027 (1976)
45. Shikata T. et al., J. Infect. Dis. 136: 571-576 (1977)
46. Shiraki K. et al., J. Pediatr. 97: 768-770 (1980)
47. Bonino F. et al., Hepatology 1: 386-391 (1981)
48. Bréchet C. et al., Hepatology 2: 278-285 (1982)
49. Berninger M. et al., J. Med. Virol. 9: 57-68 (1982)
50. Weller I.V.D. et al., J. Med. Virol. 9: 273-280 (1982)
51. Scotto J. et al., Hepatology 3: 279-274 (1983)

52. Carloni G. et al., Arch. Virol. 87: 97-105 (1986)
53. Tur-Kaspa R. et al., J. Med. Virol. 14: 17-26 (1984)
54. Harrison T.J. et al., Brit. Med. J. 290: 663-664 (1985)
55. Carloni G. et al., J. Med. Virol., in press
56. Bonino F. et al., Liver 3: 30-35 (1983)
57. Matsuyama Y. et al., Gastroenterology 89: 1104-1108 (1985)
58. Rigby P.W.J. et al., J. Mol. Biol. 113: 237-251 (1977).
59. Bassendine M.F. et al., Gastroenterology 80: 1016-1021 (1981)
60. Scullard G.H. et al., Hepatology 1: 228-232 (1981)
61. Moestrup T. et al., J. Med. Virol. 17: 337-344 (1985)

INDICE

INTRODUZIONE	Pag.	1
BIOLOGIA DEL VIRUS	"	8
L'antigene HBsAg	"	9
L'antigene HBcAg	"	12
L'antigene HBeAg	"	13
Organizzazione genetica dell'HBV	"	14
HBV e gli altri Hepadna virus	"	17
Ciclo di replicazione degli Hepadna virus	"	19
PATTERNS SIEROLOGICI DELL'INFEZIONE	"	22
PARAMETRI DI INFETTIVITA'	"	25
DETERMINAZIONE DELL'HBV NEL SIERO		
Principio del metodo	"	29
Preparazione e denaturazione del campione	"	29
Ibridazione e autoradiografia	"	31
Preparazione del probe radioattivo	"	33
CONCLUSIONI	"	35
BIBLIOGRAFIA	"	37

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei rapporti ISTISAN è dei singoli autori*

*La riproduzione parziale o totale dei "Rapporti ISTISAN"
deve essere preventivamente autorizzata dai
competenti Direttori di Laboratorio o Servizio
e dal Direttore dell' Istituto Superiore di Sanità*

*Stampato dalla Biblioteca - Settore editoriale
dell' Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma*

Roma, maggio 1986