



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

**SCUOLA DI DOTTORATO
IN SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI**

**DIPARTIMENTO
*DI SANITÀ PUBBLICA-MICROBIOLOGIA-VIROLOGIA, SEZIONE DI VIROLOGIA***

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SANITÀ PUBBLICA
*FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
CICLO XXIII***

**"CARATTERIZZAZIONE DELL'INFEZIONE DA VIRUS DELL'EPATITE B (HBV) IN
UNA COORTE DI SOGGETTI HIV-POSITIVI IN MALAWI"**

(MED/42)

**DAVIDE BRAMBILLA
MATRICOLA R07480**

TUTOR : PROF.SSA ELISABETTA TANZI

COORDINATORE DOTTORATO: PROF.SSA MIRELLA PONTELLO

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

Capitolo 1: Introduzione	pag 1
1.1 <u>Epidemiologia del virus dell'Epatite B (HBV)</u>	pag 1
1.2 <u>Caratteristiche del virus dell'Epatite B</u>	pag 2
1.3 <u>Organizzazione del genoma e ciclo replicativo</u>	pag 4
1.3.1 <i>Regione pre-S/S</i>	pag 6
1.3.2 <i>Regione pre-C/C</i>	pag 8
1.3.3 <i>ORF P</i>	pag 9
1.3.4 <i>ORF X</i>	pag 9
1.4 <u>Sottotipi e genotipi del virus dell'Epatite B</u>	pag 10
1.5 <u>Storia Naturale dell'infezione da HBV</u>	pag 10
1.6 <u>Diagnosi di laboratorio e decorso sierologico dei marcatori virali</u>	pag 12
1.6.1 <i>Marcatori sierologici in corso di infezione acuta</i>	pag 14
1.6.2 <i>Marcatori sierologici in corso di infezione cronica</i>	pag 15
1.7 <u>Epatite Acuta e Cronica</u>	pag 16

1.8	<u>Modalità di trasmissione e misure preventive</u>	pag 17
1.8.1	<i>La Vaccinazione anti-Epatite B</i>	pag 20
1.9	<u>Aspetti Terapeutici</u>	pag 20
1.10	<u>La coinfezione HBV/HIV</u>	pag 22
1.10.1	<i>Storia naturale ed interazioni delle infezioni da HIV e HBV</i>	pag 22
1.10.2	<i>Diagnosi e gestione delle epatiti croniche virali in pazienti HIV positivi</i>	pag 23
1.10.3	<i>Trattamento della coinfezione da HBV</i>	pag 24
1.10.4	<i>Comparsa di resistenza alla lamivudina dell'HBV in soggetti coinfeziti da HBV e HIV</i>	pag 25
1.10.5	<i>Comparsa di resistenza alla lamivudina dell'HIV in soggetti HBsAg positivi</i>	pag 25
1.11	<u>Le infezioni occulte da HBV</u>	pag 26
1.12	<u>L'infezione da HBV e la coinfezione HIV/HBV in Africa</u>	pag 30
1.13	<u>La situazione sanitaria in Malawi e i dati relativi all'infezione da HBV</u>	pag 31
1.14	<u>DREAM (Drug Resource Enhancement against AIDS And Malnutrition) e l'infezione da HIV</u>	pag 33
1.14.1	<i>Il laboratorio di biologia molecolare nel trattamento antiretrovirale in Africa</i>	pag 46
1.15	<u>Il personale contributo operativo all'interno del progetto DREAM</u>	pag 56
Capitolo 2:	Obiettivi	pag 57

Capitolo 3: Materiali e Metodi	pag 58
3.1 Popolazione in Studio	pag 58
3.2 Metodi	pag 60
<i>3.2.1 Indagini sierologiche condotte presso i laboratori DREAM in Malawi</i>	pag 60
<i>3.2.2 Indagini di biologia molecolare condotte presso i laboratori DREAM in Malawi</i>	pag 61
<i>3.2.2.1 La determinazione quantitativa di HBV-DNA mediante branched-DNA condotta presso i laboratori DREAM in Malawi</i>	pag 61
<i>3.2.3 Indagini di biologia molecolare condotte presso i laboratori della Sezione di Virologia del Dipartimento di Sanità Pubblica, Microbiologia e Virologia dell'Università di Milano</i>	pag 62
<i>3.2.3.1 Estrazione di HBV-DNA</i>	pag 62
<i>3.2.3.2 Amplificazione di HBV-DNA mediante nested PCR</i>	pag 63
<i>3.2.3.3 Rilevazione dei prodotti di PCR</i>	pag 65
<i>3.2.4 Saggi di nested-PCR per il sequenziamento di una porzione dei geni S e P di HBV</i>	pag 67
<i>3.2.5 Sequenziamento di una regione del gene S di HBV</i>	pag 69
<i>3.2.6 Analisi statistica</i>	pag 70
Capitolo 4: Risultati	pag 71
<u>4.1 Presentazione del progetto di studio al comitato etico in Malawi</u>	pag 71
<u>4.2 Arruolamento della popolazione in studio</u>	pag 72
<u>4.3 Indagini sierologiche condotte presso i laboratori DREAM in Malawi</u>	pag 73
<u>4.4 Indagini di biologia molecolare condotte presso i laboratori DREAM in Malawi</u>	pag 77
<i>4.4.1 Determinazione quantitativa di HBV-DNA mediante branched-DNA</i>	pag 77

<u>4.5 Indagini di biologia molecolare condotte presso i laboratori della Sezione di Virologia del Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia dell'Università di Milano</u>	pag 77
<i>4.5.1 Indagini molecolari effettuate su campioni con profilo sierologico "anti-HBc isolato" risultati al di sotto del limite inferiore di rilevabilità della metodica branched-DNA</i>	pag 78
<i>4.5.2 Sequenziamento di una regione del gene S di HBV</i>	pag 81
<u>4.6 Determinazione di marcatori di infettività in campioni con profilo sierologico "anti-HBc+ /anti-HBs+"</u>	pag 81
Capitolo 5: Conclusioni	pag 82
Capitolo 6. Allegati	pag 90
Capitolo 7. Bibliografia	pag 116

1. Introduzione

1.1 Epidemiologia del virus dell'Epatite B (HBV)

L'epatite virale di tipo B mantiene tuttora una rilevanza primaria a livello mondiale. Secondo recenti stime effettuate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), si calcola che esistano globalmente più di 350 milioni di soggetti portatori del virus dell'epatite B (HBV), circa il 5% della popolazione mondiale, e che circa il 25% di questi possa sviluppare nel tempo malattia epatica severa, come epatite cronica, cirrosi e carcinoma epatocellulare, con oltre un milione di decessi annui imputabili a tale infezione. [1-5].

In base al tasso di prevalenza di soggetti portatori dell'antigene di superficie di HBV (HBsAg), nel mondo si riconoscono tre diverse aree a differente diffusione endemica (Figura 1). Le zone ad elevata endemia (>8%) comprendono l'Africa Sub-Sahariana, il Sud Est Asiatico, il bacino Amazzonico e le regioni del Pacifico; in questi Paesi vive circa il 45% della popolazione mondiale, a rischio di infezione con HBV in giovane età per contagio interumano, o attraverso la via verticale/perinatale. Alle aree a prevalenza intermedia (2-7%), come Sud America ed Europa Orientale, appartiene il 43% della popolazione, che acquisisce l'infezione nel corso della vita a qualsiasi età. Infine, l'infezione coinvolge soprattutto soggetti in età adulta nel restante 12% della popolazione, che risiede nelle zone a bassa endemia (<2%), come USA, Europa Occidentale, Australia e Nuova Zelanda.

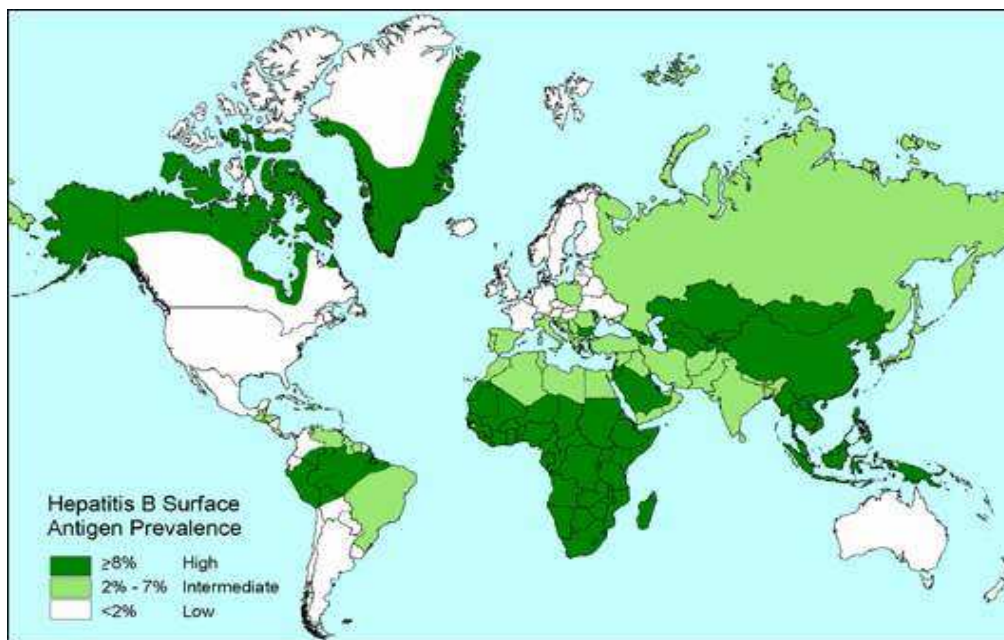


Figura 1: Prevalenza HBV nel mondo. Fonte: CDC Atlanta.

1.2 Caratteristiche del virus dell'Epatite B

Il virus dell'epatite virale di tipo B (HBV) è l'archetipo della famiglia delle *Hepadnaviridae*, cui appartengono altri virus con caratteristiche di specie specificità quali il virus dell'epatite dell'anatra (DHBV), dello scoiattolo di terra (*Spermophilus beccheyi*, GSHV) della marmotta nord-americana (*Marmota monax*, WHV), che condividono con l'HBV l'elevato tropismo per il tessuto epatico, la presenza di un genoma a DNA a peculiare strategia replicativa e la capacità di instaurare infezioni persistenti.

Al microscopio elettronico HBV appare come una particella sferica, denominata particella di Dane, di 42 nm di diametro, costituita da un involucro esterno lipoproteico (envelope) e da una particella interna di 30-35 nm di diametro (core o nucleocapside virale) formata da un rivestimento proteico (capside) a simmetria icosaedrica che racchiude il DNA ed una DNA-polimerasi (Figura 2).

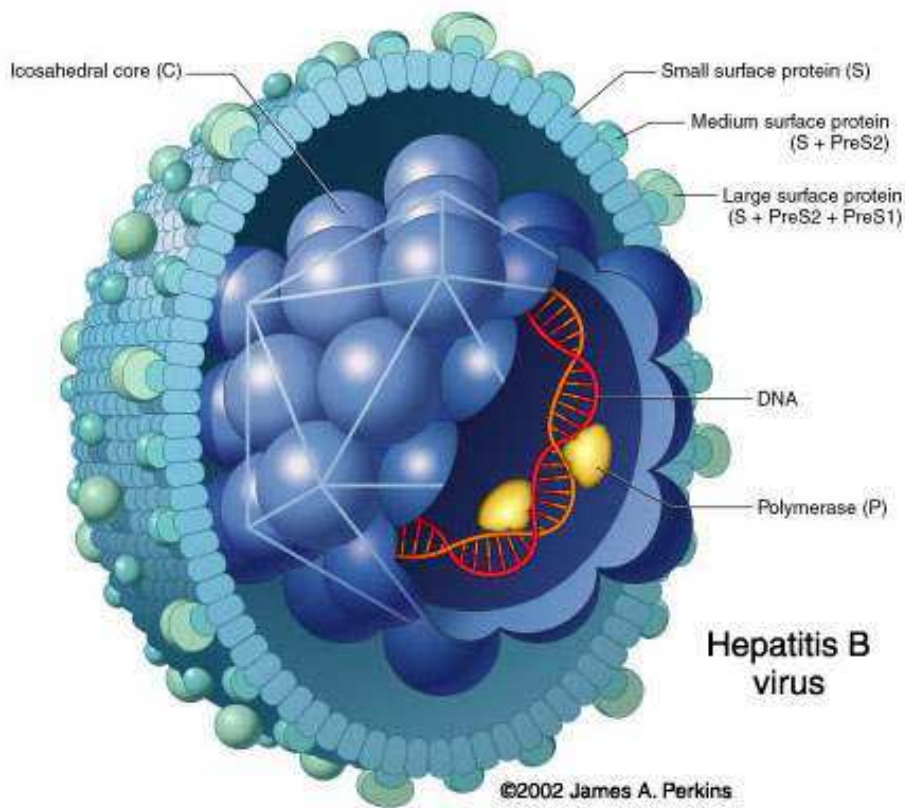


Figura 2: Struttura del virus dell'epatite B.

La particella di Dane è la forma completa dell'HBV, tuttavia in corso di infezione si riscontrano in circolo altre due forme morfologicamente distinte: sferule di circa 22 nm di diametro e tubuli di lunghezza variabile che rappresentano strutture virali difettive, prive di acido nucleico e quindi non infettanti, risultato dell'eccessiva produzione delle proteine dell'envolo durante la replica virale. (Figura 3) [6-8].

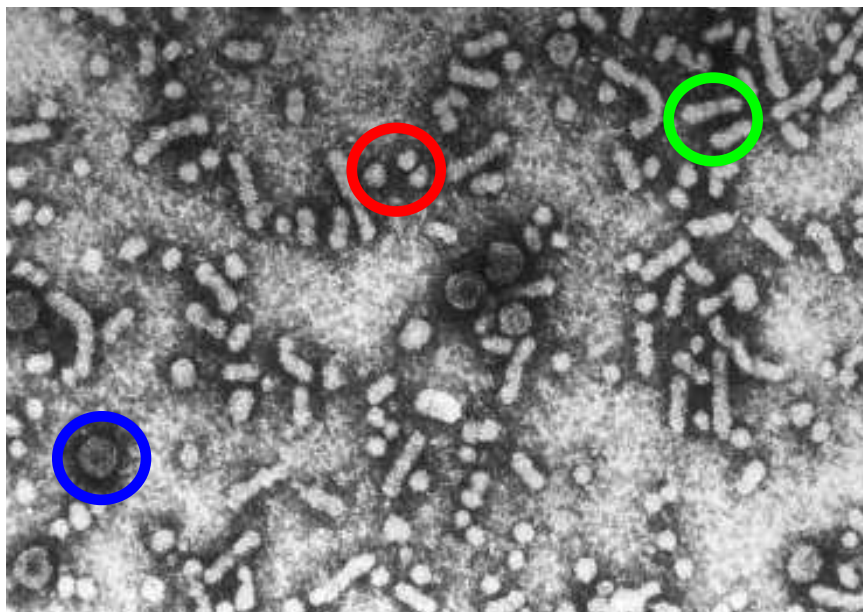


Figura 3: Immagine a microscopia elettronica del siero di un paziente infetto da HBV. In evidenza il virus (blu), le sferule (rosso) ed i tubuli (verde)

utilizzato dai Retrovirus, poiché utilizza come stampo un intermedio ad RNA. Il cccDNA serve infatti come template per la trascrizione, ad opera di una RNA-polimerasi DNAdipendente della cellula ospite, di un RNA pregenomico e di forme multiple di RNA genomico, tradotte in seguito a proteine nel citoplasma dell'epatocita.

L'RNA pregenomico viene invece incapsidato e retrotrascritto dalla polimerasi virale, che assume in questo caso funzione di trascrittasi inversa, generando un ibrido DNA-RNA. La successiva degradazione dell'RNA pregenomico ad opera di una RNasi-H genera la catena di DNA a polarità negativa. Nell'ultimo stadio la polimerasi virale sintetizza parte della catena positiva, che rimane incompleta; si ha quindi l'assemblaggio dei virioni maturi ed il successivo rilascio in circolo (Figura 5) [7, 9, 10].

La polimerasi virale è in grado di catalizzare questi processi essendo composta da quattro domini:

- (1) il dominio di "priming";
- (2) il dominio "spacer";
- (3) il dominio di trascrittasi inversa, che catalizza la sintesi del DNA RNA-dipendente;
- (4) il dominio RNasi-H, che degrada l'RNA del risultante ibrido DNARNA.

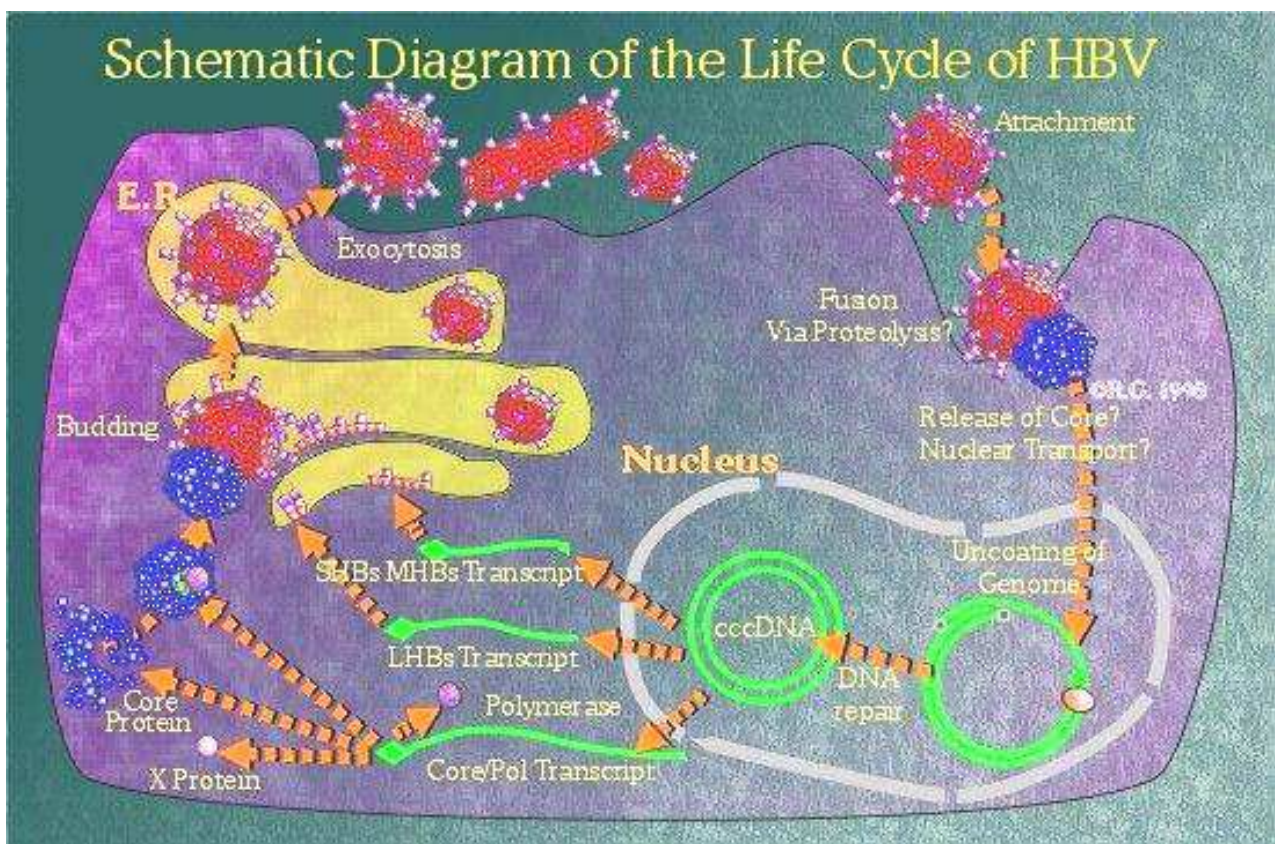


Figura 5: Ciclo replicativo di HBV.

Poichè il DNA virale negli epatociti infetti rimane non integrato, come minicromosoma episomale, la polimerasi di HBV è a differenza della polimerasi retrovirale, priva di un dominio di integrazione [7].

Il DNA di HBV è strutturalmente complesso. Si riconoscono 4 ORF (open reading frames) ampiamente sovrapposte tra di loro, di modo che sequenze nucleotidiche comuni possano venire utilizzate, a partire da differenti siti di inizio traduzione, per la sintesi di 7 proteine con struttura e funzioni diversificate fra loro. Delle 4 regioni genomiche, due (pre-S/S e pre-C/C) codificano per proteine strutturali dell'envelope e del core, mentre le altre due (P e X) per proteine funzionali, rispettivamente la polimerasi virale e proteine a funzione ancora parzialmente sconosciuta.

1.3.1 Regione pre-S/S

La regione pre-S/S comprende il gene S ed altre due porzioni geniche che lo precedono, denominate pre-S1 e pre-S2, e contiene tre differenti codoni di inizio traduzione (start codon). La presenza invece di un unico stop codon spiega la sintesi di tre differenti proteine con una comune porzione carbossiterminale (Figura 6).

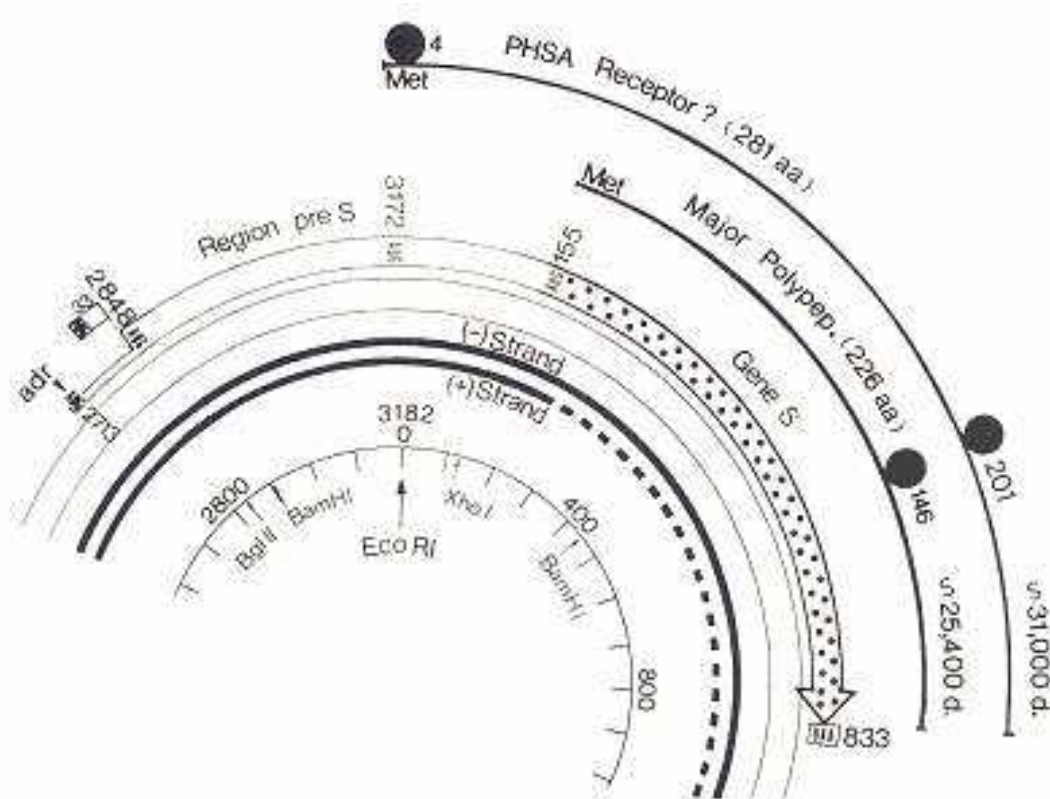


Figura 6: Regione pre-S/S.

La proteina "middle" (pre-S2, p33 e gp36), codificata dalla regione pre-S2 e dal gene S, e la "large" (pre-S1, p39 e gp42) codificata dal gene S e da entrambe le regioni preS1 e preS2, sono rispettivamente costituite da 55 e 108-119 aminoacidi in più rispetto alla "major"; sono meno rappresentate sulla superficie virale e contengono i siti d'attacco all'epatocita, nonché diversi epitopi delle cellule B e T. L'adesione e la successiva entrata del virus nella cellula sono probabilmente mediate da recettori proteici che interagiscono con i fosfolipidi della membrana.

L'espressione di queste tre proteine è regolata sia a livello trascrizionale che a livello traduzionale: all'estremità 3' del gene S è localizzato un promotore la cui attività dipende da fattori nucleari specifici degli epatociti, mentre un secondo promotore non organo-specifico è localizzato nella regione pre-S1 [12].

1.3.2 Regione pre-C/C

Sia la proteina del core (HBcAg) che la proteina di secrezione e (HBeAg) sono prodotti dell'ORF pre-C/C e condividono circa 160 aminoacidi. In particolare, all'interno della regione pre-C/C sono presenti due start codon, di cui il primo individua il gene C, codificante per HBcAg, ed il secondo la regione pre-C che, insieme al gene C, codifica per una proteina necessaria alla sintesi e secrezione dell'HBeAg. Quest'ultimo è un frammento polipeptidico dell'HBcAg che acquisisce la sua configurazione finale dopo un processamento post-traduzionale.

L'HBeAg non è un componente della particella virale, ma è presente nel siero del soggetto infetto ed è un marcatore di attiva replicazione e, quindi, di infettività; l'HBeAg viene inoltre espresso sulla superficie degli epatociti insieme all'HBsAg ed è un importante bersaglio della risposta immune dell'ospite che porta alla distruzione della cellula infetta. Come detto, la sintesi dell' HBeAg origina dalla trascrizione e traduzione delle regioni pre-core e core del genoma dell'HBV. La proteina così sintetizzata consta di una sequenza amino-terminale di 19 aminoacidi che funge da sequenza segnale per l'indirizzo della proteina nascente nel reticolo endoplasmico e la sua traslocazione. L'HBeAg, prima di essere secreto, subisce un ulteriore processo di maturazione con proteolisi della sequenza segnale e dell'estremità carbossi-terminale ricca di arginina. La secrezione dell'HBeAg nel torrente circolatorio è connessa con la replica virale e lo spegnimento di quest'ultima si

associa inevitabilmente all'eliminazione dell'HBeAg e alla sieroconversione ad anti-HBe. Poichè l'HBeAg viene sintetizzato e secreto in circolo in grande quantità sembra abbia la funzione di "distrarre" la risposta immunitaria (anticorpi e linfociti T citotossici) affinché non raggiunga il vero bersaglio, costituito dalla cellula infettata. L'HbcAg è il principale componente strutturale del nucleocapside e possiede in posizione carbossiterminale un dominio di 35 residui aminoacidici, ricco in arginina, ad elevata affinità per l'RNA e quindi favorente la formazione del capsid [13-15].

1.3.3 ORF P

Oltre a proteine strutturali e di secrezione, l'HBV è in grado di sintetizzare diverse proteine non-strutturali. Il gene P, così esteso da includere porzioni di tutte le altre regioni genomiche, comprende quattro distinti domini, tutti codificanti per enzimi essenziali al ciclo di replicazione virale. Esso esprime una poliproteina comprendente in posizione aminoterminale la DNA polimerasi-RNA dipendente (trascriptasi inversa), che si lega covalentemente all'estremità 5' del filamento di DNA(-), permettendo così la retrotrascrizione e la formazione dell'ibrido DNA-RNA. In posizione carbossi-terminale è invece localizzata la RNasi-H, proteina che esplicando la sua attività proteolitica nei confronti dell'ibrido precedentemente formato, permette la sintesi del filamento (+) [9].

1.3.4 ORF X

L'ORF X codifica per una proteina non-strutturale (HBX), di 154 aminoacidi, a funzione non del tutto chiarita, sebbene studi condotti con il WHV (virus della marmotta) ne abbiano dimostrato il ruolo attivo nella replicazione virale e studi in vitro abbiano evidenziato la sua funzione transattivante nei confronti della trascrizione di geni virali e cellulari.

Si ritiene infatti che il gene X codifichi per due proteine dotate di attività transattivante di enhancer di HBV favorendo così la replicazione virale. Queste proteine possono transattivare anche altri geni cellulari che possono giocare un importante ruolo nell'epatocarcinogenesi [16,17].

1.4 Sottotipi e genotipi del virus dell'Epatite B

L'HBsAg è una proteina eterogenea che presenta differenti sottotipi. Si riconoscono un determinante comune *a* e due coppie di determinanti minori, *d/y* e *w/r*, che caratterizzano quattro sottotipi principali: *adw*, *adr*, *ayw* e *ayr*. Tali sottotipi hanno una differente distribuzione geografica ed una rilevanza esclusivamente epidemiologica: l'*adw* predomina nelle Americhe, in Nord Europa ed in Australia, mentre l'*ayw* è frequente nell'Africa Nord-Occidentale, nell'Europa Orientale e Meridionale, nel Medio Oriente, l'*adr* si riscontra in Giappone e nel Sud-Est Asiatico ed infine l'*ayr*, molto poco diffuso, si ritrova nei paesi asiatici. I diversi sottotipi di HBsAg sono l'espressione fenotipica di variazioni a livello genomico, tuttavia l'analisi delle sequenze mostra come questi non corrispondano inequivocabilmente a specifici genotipi. Sono stati infatti riconosciuti 9 sottotipi e, sulla base di divergenze di sequenza dell'intero genoma superiori all'8%, 8 genotipi di HBV, denominati con lettere maiuscole da A a H [18, 19].

I genotipi di HBV mostrano, in analogia ai sottotipi, una distribuzione di tipo geografico ma, diversamente da questi, sembrano assumere un significato di tipo clinico, essendo stati associati a quadri diversi di malattia epatica.

1.5 Storia naturale dell'infezione da HBV

L'infezione con HBV può dare luogo ad esiti diversi, strettamente correlati sia a fattori dell'ospite, quali l'età di acquisizione, il sesso e lo stato di immunocompetenza, sia alla biologia del virus e/o alla presenza di coinfezioni virali o altre cause di danno epatico, come ad esempio l'abuso di alcol [8, 20].

In circa il 90% dei casi l'infezione decorre in maniera asintomatica, mentre solo il 10% degli infetti sviluppa una epatite acuta, clinicamente manifesta che, nel 90% dei casi, evolve verso la guarigione con acquisizione dell'immunità verso eventuali reinfezioni. La presenza di sintomatologia è correlata all'età di infezione, essendo più frequente in adulti e bambini sopra i 5 anni (33-50% dei casi), rispetto ai bambini di età inferiore (5-15%), mentre generalmente i neonati non sviluppano malattia clinica.

Infine, in rari casi (<1%) l'epatite acuta assume forma fulminante, con elevati tassi di mortalità (Figura 8).

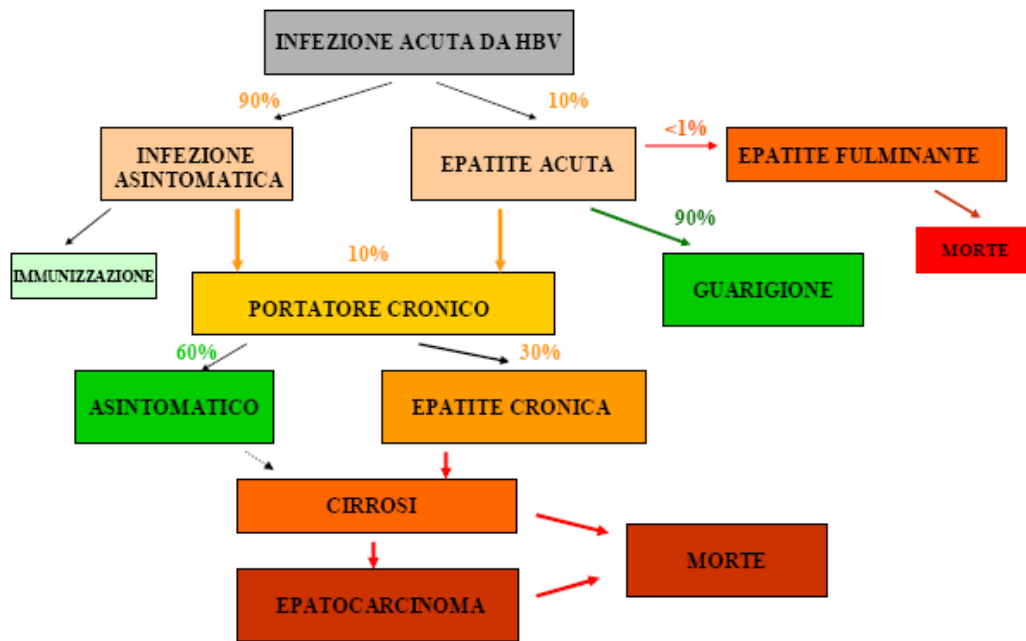


Figura 8: storia naturale dell'infezione da HBV

L'infezione cronicizza con persistenza dell'antigene HBsAg nel 10% dei casi; la cronicizzazione presenta quadri evolutivi differenti, potendosi instaurare sia lo stato di "portatore sano", caratterizzato da istologia epatica normale o con minime lesioni e funzionalità epatica conservata, oppure, in circa un terzo dei casi, un'epatite cronica con possibile sviluppo di cirrosi e/o epatocarcinoma (HCC). L'HCC è una delle forme di cancro più diffuse al mondo e HBV è responsabile di almeno il 75% di queste neoplasie [21].

L'età rappresenta un fattore di preminente importanza nel determinare l'evoluzione in cronicità di una infezione da HBV: se acquisita infatti in età neonatale o nei primi anni di vita cronicizza, rispettivamente, fino al 90% e al 50% dei casi. Tali percentuali decrescono progressivamente con il crescere dell'età fino ad attestarsi su valori intorno al 5-10% per i soggetti adulti. Anche la severità del quadro clinico è inversamente correlata all'età in cui si instaura l'infezione cronica, come risultato del lungo periodo di tempo necessario all'evoluzione del danno epatico [22, 23].

1.6 Diagnosi di laboratorio e decorso sierologico dei marcatori virali

Per la diagnosi di epatite virale di tipo B ci si avvale, oltre che dei test biochimici di funzionalità epatica, della determinazione sierologica di tre specifici sistemi antigene/anticorpo: HBsAg/Anti-HBs, Anti-HBc (IgM e IgG), HBeAg/Anti-HBe [8].

Questi marcatori di infezione possono essere ricercati mediante impiego di metodi immunoenzimatici (EIA, MEIA) commerciali, altamente sensibili e specifici.

Tecniche di ibridazione del DNA e metodiche di biologia molecolare (PCR, bDNA) vengono invece impiegate per la determinazione qualitativa e quantitativa del DNA virale. L'HBV-DNA è già dosabile dopo una settimana dall'infezione, ma generalmente non viene utilizzato come test di diagnosi della fase acuta, bensì solo per indagini particolari o nel monitoraggio dell'epatite cronica, soprattutto se il soggetto viene sottoposto a trattamento terapeutico.

In linea generale, il ciclo vitale di HBV può essere suddiviso in quattro stadi, il primo dei quali, detto di "immunotolleranza", comprende il periodo di incubazione caratterizzato da attiva replicazione virale con conseguente comparsa di HBeAg e di grandi quantità di HBV-DNA nel siero. Segue poi un secondo stadio detto di "epatite attiva" nel quale, pur continuando la replicazione virale, si assiste ad una diminuzione dei livelli sierici di HBVDNA; con il terzo stadio di "clearance" virale si entra nella fase integrativa con scomparsa di HBeAg. Nell'ultimo stadio di "immunità" HBsAg scompare lasciando il posto ai rispettivi anticorpi anti-HBs. Ogni stadio dell'infezione da HBV è quindi contraddistinto da uno specifico quadro di markers sierologici (Tabella 1).

MARKERS	FASE REPLICATIVA		FASE INTEGRATIVA	
	<i>Stadio 1</i>	<i>Stadio 2</i>	<i>Stadio 3</i>	<i>Stadio 4</i>
<i>HBsAg</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
<i>Anti-HBs</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
<i>HBV-DNA</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
<i>Anti-HBc</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>HBeAg</i>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Anti-HBe</i>	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
<i>ALT, AST</i>	Normali	Elevati	Normali	Normali

Tabella 1. Markers di infezione da HBV rilevabili nei diversi stadi di malattia.

1.6.1 Marcatori sierologici in corso di infezione acuta

L'infezione acuta da HBV è caratterizzata da una prima fase di replicazione del virus a livello epatico, con produzione di virioni completi e presenza in circolo dei marcatori di replica virale. Tra questi, l'HBsAg è il primo ad essere determinabile, in media 5-6 settimane dopo l'esposizione al virus e da 2 a 8 settimane prima dell'esordio dell'epatite acuta (Figura 9).

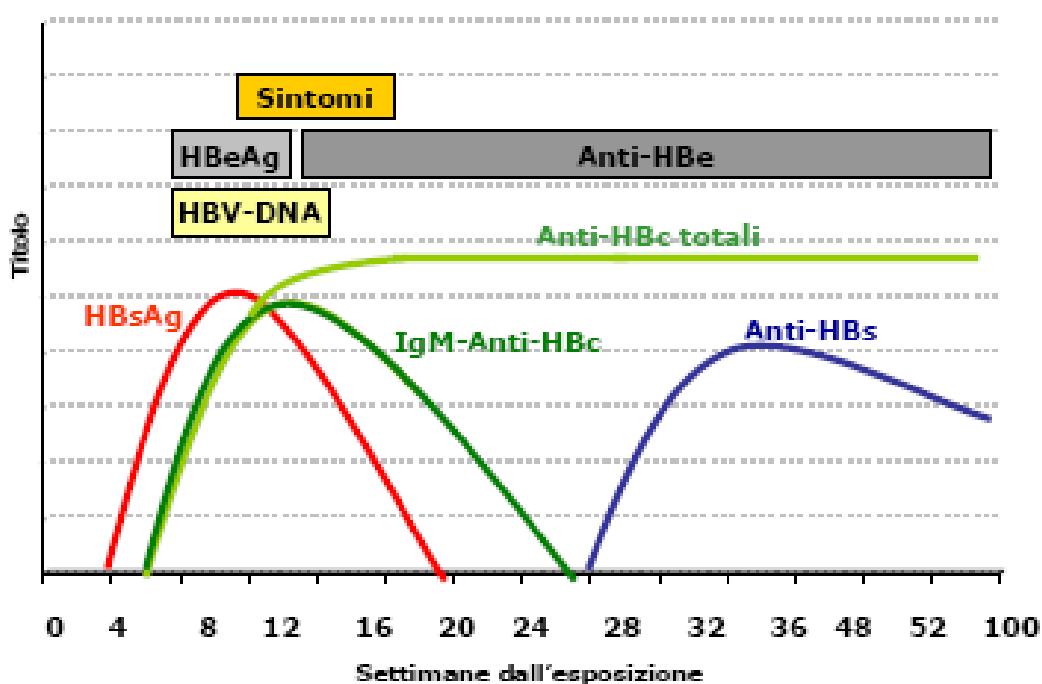


Figura 9: Andamento sierologico dei marcatori in corso di infezione acuta da HBV con evoluzione a guarigione.

Già nel periodo di incubazione sono dosabili anche gli antigeni pre-S1 e pre-S2. A pochi giorni di distanza dall'HBsAg, compare in circolo l'HBeAg, quale indice di attiva replica e di infettività. In questa stessa fase sono presenti sia l'HBV-DNA sierico che anticorpi anti-HBc, come ultimo marcatore sierologico in fase di convalescenza, di anticorpi anti-HBs, la cui presenza indica guarigione e protezione da nuove infezioni. Nel caso l'infezione acuta sia sostenuta non da virus wild-type, ma dal mutante precore di HBV, l'HBeAg non è determinabile nel siero [24].

1.6.2 Marcatori sierologici in corso di infezione cronica

Si considera instaurata una infezione di tipo cronico quando l'HBsAg persiste per un periodo superiore a 6 mesi, in presenza di anticorpi anti- HBc di classe IgG, che possono persistere insieme ad anticorpi di classe IgM a basso titolo, consentendo di discriminare questa fase da quella acuta, dove invece risultano molto elevati (Figura 10).

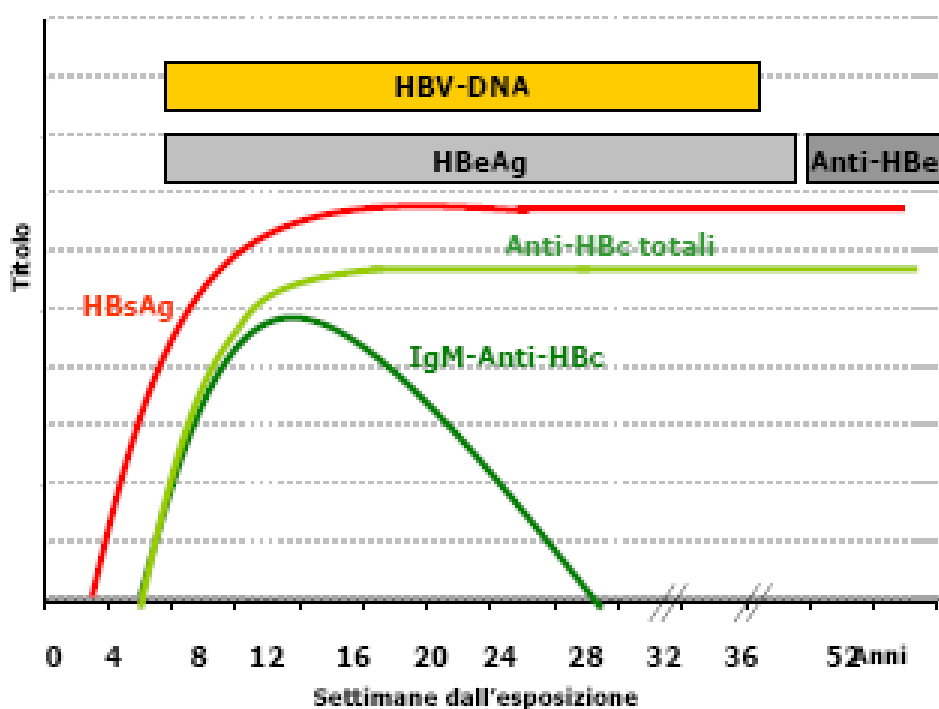


Figura 10: Andamento sierologico dei marcatori in corso di infezione acuta da HBV ad evoluzione cronica.

HBV-DNA ed HBeAg sono determinabili ad elevate concentrazioni, ma possono scomparire nel tempo se la replicazione virale cessa o se intervengono mutazioni che inibiscono la sintesi della proteina precursore di HBeAg. La presenza di anticorpi anti-HBe con alta replica virale denota una infezione con varianti precoci di HBV, mentre positività per HBsAg ed anti-HBe con apparente soppressione della replicazione virale (HBV-DNA negatività) si riscontra nei portatori cronici asintomatici del virus [25].

1.7 Epatite acuta e cronica

Nei casi acuti clinicamente manifesti, la sintomatologia insorge, dopo un periodo di incubazione medio di 2-3 mesi, in modo insidioso con malessere, nausea, dolori addominali e muscolari, febbre lieve e aumento delle transaminasi con incrementi variabili da lievi o moderati (da 3 a 10 volte i valori normali) fino a incrementi superiori a 100 volte il range di normalità (limite max di ALT a 25°C in condizioni di normalità 22 UI/l per gli uomini e 18 UI/l per le donne). Dopo qualche giorno può comparire ittero (nel 25-35% dei casi) con presenza di urine scure, feci chiare e colorazione giallastra di cute, mucose e congiuntive. Un'elevata carica virale, come può avvenire nel caso di trasfusioni con sangue infetto, ed un breve periodo di incubazione sono maggiormente correlati alla manifestazione clinica con ittero [7, 20].

Dal momento che l'espressione delle proteine virali ed il rilascio di virioni in circolo precedono l'evidenza biochimica del danno epatico e che l'HBsAg può persistere nelle cellule epatiche di soggetti definiti come portatori "sani", si deduce come l'HBV non sia direttamente citopatogeno. Nel determinismo del danno epatico e della risoluzione dell'infezione intervengono meccanismi complessi che coinvolgono sia l'immunità cellulare che umorale. Dopo essere penetrato nell'epatocita, il virus determina la sintesi e l'espressione di diversi epitopi sulla membrana cellulare, in particolare antigeni virali quali HBeAg e HBcAg, in associazione ad antigeni HLA di classe I; questo evento scatena una risposta T-citotossica (CTL) mirata all'eliminazione del virus intracellulare sia direttamente mediante attacco alla membrana cellulare tramite MAC (Complesso di Attacco alla Membrana) ed induzione all'apoptosi delle cellule infettate, che tramite rilascio di citochine, come IFN- α e TNF α , che inibiscono l'espressione dei geni virali e la replicazione. Interviene inoltre la componente T-helper, che induce produzione di citochine con funzione sia chemiotattica per le cellule infiammatorie, che di ausilio per la risposta di tipo umorale mediata da cellule B, con produzione di anticorpi neutralizzanti verso antigeni S e pre-S in grado di bloccare le particelle virali in circolo [26].

L'infezione di un consistente numero di cellule epatiche in concomitanza con una risposta immune efficace e tempestiva espone però il paziente al grave rischio di una epatite fulminante. Se la risposta immunitaria non è sufficiente a controllare ed eliminare l'infezione, questa cronicizza definendo appunto portatore cronico di HBsAg un soggetto in cui l'antigenemia perduri per più di 6 mesi; a livello epatico, lo stato infiammatorio assume

gravità variabile, più moderato rispetto a quello evidenziato nell'epatite acuta, ma il fatto che possa persistere per anni o decenni spiega l'evoluzione verso epatite cronica e cirrosi, esponendo infine il soggetto ad un maggior rischio di sviluppo di carcinoma epatocellulare. I fattori ed i meccanismi che determinano la cronicizzazione dell'infezione non sono del tutto conosciuti; si possono tuttavia definire alcuni fattori di rischio quali il sesso maschile, uno stato immunitario depresso e la mancata produzione di interferone [27].

Un'infezione contratta negli ultimi mesi di vita fetale o nei primi mesi dopo la nascita, quando il sistema immunitario non è ancora completamente sviluppato, si traduce in infezione cronica poiché il virus, che non è riconosciuto come estraneo e non è rigettato dal sistema immunitario, si replica nelle cellule epatiche. Si osserva una situazione analoga in soggetti immunodepressi naturalmente o a seguito di terapie immunosoppressive nei quali il virus, dopo essersi replicato attivamente per molto tempo, si integra nel genoma delle cellule epatiche [23].

Un punto chiave, anche se non l'unico, nell'induzione del tumore è rappresentato dall'integrazione del DNA di HBV nel genoma dell'ospite; questo meccanismo è "random", nel senso che non avviene in siti preferenziali del genoma cellulare e, casualmente, potrebbe portare all'attivazione di geni "promoters" cellulari. Alla proteina X di HBV è riconosciuta la funzione di potente transattivante e frequentemente viene ritrovata nei soggetti con epatocarcinoma, anche se l'esatto ruolo svolto nella carcinogenesi non è stato ancora chiarito [28].

1.8 Modalità di trasmissione e misure preventive

Il virus dell'epatite B, pur replicandosi nel fegato, circola soprattutto nel sangue; è tuttavia ben riconosciuta la presenza del virus in altri liquidi organici quali sperma, saliva, secrezioni vaginali, sudore e lacrime. Feci, urine e latte materno contengono scarse quantità del virus a meno che non siano contaminate con sangue.

Il virus dell'epatite B si trasmette quindi principalmente per via parenterale, sessuale e verticale/perinatale [7].

Per molti anni la trasfusione del sangue e dei suoi derivati ha rappresentato un grave rischio di infezione, tanto che l'epatite B era conosciuta come "epatite da siero" o "da trasfusione". Dopo l'introduzione dello "screening" obbligatorio per HBsAg dei donatori di

sangue e l'impiego di sistemi di inattivazione virale per la sterilizzazione dei fattori della coagulazione, il rischio di epatite B per via trasfusionale si è significativamente ridotto, anche se non del tutto azzerato (Tabella 2).

FATTORI DI RISCHIO PER L'EPATITE B	<i>Fattore di rischio</i>	Fascia di età			TOTALE (%)
		0-14(%)	15-24(%)	>25(%)	
	Trasfusione sangue	1 (20)	0	14 (3)	15 (3)
	Interventi chirurgici	0	10 (14)	78 (15)	88 (15)
	Visita ginecologica	0	5 (26)	23 (21)	28 (22)
	Ospedalizzazione	2 (40)	8 (12)	86 (18)	96 (17)
	Altre esposizioni parenterali	1 (25)	25 (33)	159 (31)	185 (32)
	Terapia odontoiatrica	0	28 (39)	159 (32)	187 (32)
	Uso di droghe e.v.	0	12 (17)	55 (11)	67 (12)
	Convivente tossicodipendente	0	1 (2)	11 (2)	12 (2)
	Contatto con itterico nei sei mesi	1 (33)	11 (18)	42 (9)	54 (11)
	<i>Partners (>1 nell'ultimo anno)</i>	0	20 (54)	121 (36)	141 (37)
	Convivente di soggetto HBsAg+	0	7 (14)	34 (9)	41 (9)
	TOTALE** (100%)	5	79	525	609

Tabella 2: Casi* notificati di epatite B con fattore di rischio identificato. SEIEVA 2005. *I casi possono avere più di un fattore di rischio. **Per alcuni casi l'informazione relativa ad alcuni fattori di rischio non è disponibile.

Le modalità più frequenti di trasmissione dell'HBV nei Paesi industrializzati sono la via sessuale e lo scambio di siringhe infette durante l'assunzione di droghe per via parenterale. In ambito familiare o in comunità l'infezione da HBV può diffondersi dai soggetti infetti (portatori) ai suscettibili anche attraverso l'uso comune di oggetti potenzialmente contaminati (forbici, rasoi, spazzolini, ecc.). Altre modalità di trasmissione parenterale includono pratiche non sempre sicure, se non si osservano norme igieniche e di disinfezione/sterilizzazione, quali piercing, tatuaggi, manicure e pedicure.

La via verticale/perinatale gioca un ruolo determinante nella diffusione del virus B in alcuni Paesi asiatici dove la prevalenza di portatori di HBsAg viremici (positività per HBeAg e/o HBVDNA) è elevata, mentre l'importanza di questa via di trasmissione risulta notevolmente più modesta in Europa e in USA [1].

In Italia, come del resto dei Paesi industrializzati, l'incidenza di epatite B ha subito, negli ultimi anni, un costante decremento, grazie al sistematico controllo dei donatori di sangue, all'introduzione di misure generali di prevenzione (educazione sanitaria, adozione di precauzioni universali, idonea sterilizzazione del materiale riutilizzabile, adeguato smaltimento del materiale a perdere, ecc.) e, soprattutto, alla profilassi immunitaria, in particolare attraverso programmi di vaccinazione (Figura 11). [8].

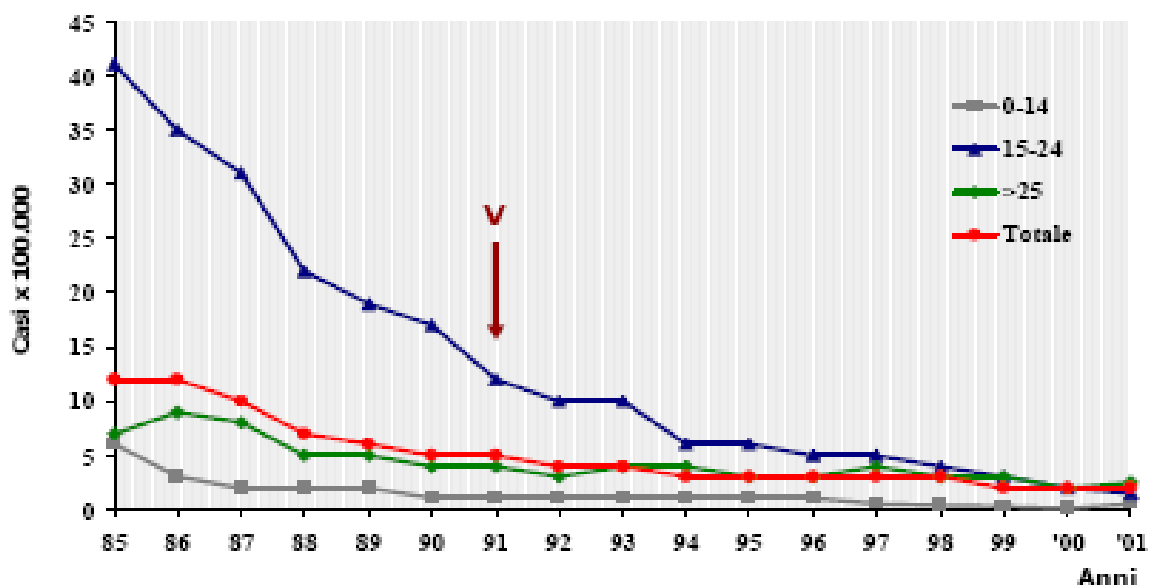


Figura 11: Tassi di incidenza ($\times 10^5$) di epatite B in Italia per età ed anno (SEIEVA 1985-2001)

1.8.1 La vaccinazione anti-epatite B

I dati epidemiologici disponibili sulla diffusione dell'HBV e sulle sue sequele croniche evidenziano come il problema dell'epatite di tipo B sia, anche se in declino rispetto a pochi anni fa, di primaria importanza. Poichè la terapia è spesso inefficace e l'uso di interferone è di sovente accompagnato da effetti collaterali anche gravi, l'unica vera arma disponibile è la prevenzione attuabile attraverso la vaccinazione.

Fin dal 1991 l'OMS raccomanda ad ogni Paese a livello mondiale l'inserimento della vaccinazione anti-epatite B nei programmi sanitari nazionali e, a giugno del 2002, risultavano 154 i Paesi aderenti a questa iniziativa.

1.9 Aspetti terapeutici

Poichè oltre il 90% degli adulti risolvono spontaneamente l'infezione da HBV, l'epatite B acuta non richiede una terapia specifica; può essere indicato un trattamento degli eventuali sintomi (nausea, anoressia, vomito).

Al contrario per la terapia dell'epatite cronica B sono stati valutati numerosi farmaci, molti dei quali si sono rivelati inefficaci, o con tossicità elevata alle dosi terapeutiche [29].

In corso di epatite cronica la terapia viene attuata con diversi obiettivi: a) ridurre o eliminare la replica virale; b) migliorare lo stato infiammatorio a livello epatico e, se presente, far regredire o stabilizzare il processo fibrotico; c) prevenire lo sviluppo di cirrosi e carcinoma epatocellulare.

Interferone alfa. Il trattamento terapeutico con IFN- α è in uso fin dal 1986 ed il rationale per l'utilizzo di questa sostanza deriva dal fatto che possiede effetti sia antivirali che immunomodulanti, stimolando l'attività dei linfociti T-helper, inibendo i T-suppressor e causando una maturazione dei linfociti B. L'indicazione primaria al trattamento è per pazienti con aumento delle ALT di durata superiore ai 6 mesi e segni di attiva replica virale. L'efficacia dell'IFN è stata valutata in diversi "trials" clinici; in soggetti cronici HBeAg positivi si evidenzia una risposta virologica, con eliminazione di HBV-DNA e HBeAg circolante, in circa il 30% dei trattati a fine terapia. Il follow-up successivo dimostra come la risposta venga mantenuta nel tempo in questi pazienti, mentre in soggetti anti-HBe/HBVDNA positivi la malattia si riattiva, con ricomparsa del DNA virale nell'80% circa dei responders.

Limitazioni all'uso dell'IFN derivano dal fatto che deve essere somministrato per via parenterale, ha effetti collaterali, non può essere utilizzato per pazienti con cirrosi scompensata ed ha uno scarso o nullo effetto se la carica virale è elevata [30].

Lamivudina. Dal 2000 è disponibile la lamivudina, un analogo nucleosidico inibitore della trascrittasi inversa e quindi attivo sia verso HBV che HIV. Gli analoghi nucleosidici sono composti che, dopo somministrazione, vengono fosforilati e competono per l'incorporazione nelle sequenze di DNA virale. Rispetto all'IFN- α , la lamivudina presenta diversi vantaggi, tra cui migliore tollerabilità somministrazione per via orale, possibilità e sicurezza di impiego anche in pazienti con cirrosi scompensata, ripristino della risposta immunitaria (mediata da cellule T) del paziente conseguente al rapido decremento della viremia indotto dal farmaco.

Lo svantaggio deriva dalla possibilità di emergenza di mutanti farmacoresistenti. Le più comuni, nel dominio YMDD del gene che codifica per la polimerasi, non sembrano evidenziarsi prima delle iniziali 36 settimane di terapia. Resistenze genotipiche sono state osservate nel 15-25% di pazienti trattati per 1 anno, mentre la percentuale sale al 49% ed al 67% in pazienti che completano il ciclo terapeutico a 3 e 4 anni rispettivamente. Queste mutazioni possono condizionare l'esito della terapia, anche se il reale impatto clinico non è stato ancora ben chiarito. Severe riattivazioni si possono osservare in pazienti con epatopatia grave; in molti pazienti invece il mantenimento della terapia nonostante la presenza di mutazione sembra stabilizzare livelli di HBV-DNA e di ALT su livelli più bassi rispetto al basale, suggerendo un possibile effetto del farmaco anche sul virus mutato [31].

Famciclovir. Altri antivirali vengono impiegati nei casi di resistenza alla lamivudina e, tra questi, il famciclovir; si tratta anche in questo caso di un analogo nucleosidico, a somministrazione orale, ben tollerato. Come la lamivudina, induce un rapido declino della carica virale e, in alcuni pazienti, si osserva clearance di HBeAg e diminuzione dei valori di ALT. Anche in seguito a terapia con famciclovir si osserva l'emergenza di mutazioni, meno frequenti rispetto a lamivudina, nel gene della polimerasi, associate a ceppi farmacoresistenti [32].

Attualmente sono in fase di sperimentazione nuovi farmaci, come l'adeflovir e l'entecavir, che sembrano essere efficaci nel trattamento di pazienti con mutanti lamivudino-resistenti.

1.10 La coinfezione HBV/HIV

Il virus dell'epatite B (HBV) ed il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) condividono le stesse vie di trasmissione: il sangue, i rapporti sessuali e la via materno-infantile [33]. Per questo motivo la coinfezione da virus epatite è molto frequente nei soggetti con infezione da HIV.

1.10.1 Storia naturale ed interazioni delle coinfezioni da HIV e HBV

Le epatiti croniche da HBV evolvono in cirrosi epatica nel 20-30% dei soggetti entro 10-40 anni dall'infezione [34]. L'infezione da HIV determina una progressiva insufficienza del sistema immunitario, che trova il suo indice più manifesto nella progressiva deplezione del patrimonio dei linfociti T CD4+ e che esita naturalmente in AIDS nella maggior parte dei soggetti entro 15 anni dall'infezione [33]. E' chiaro quindi che in un soggetto coinfecto da HBV e HIV risulti prioritario il trattamento nei confronti dell'infezione da HIV.

Tuttavia, in seguito al rallentamento della progressione dell'infezione da HIV indotto dall'impiego di terapie antiretrovirali di combinazione altamente efficaci (HAART), la cirrosi scompensata sta diventando una rilevante causa di mortalità e morbosità nei soggetti sieropositivi per HIV [35, 36].

Sebbene il danno epatico nei pazienti HIV sia da considerarsi multifattoriale (abuso alcolico, tossicità da farmaci, coinvolgimento epatico in corso di neoplasie e infezioni opportunistiche), le coinfezioni da virus epatotropi ne rappresentano la causa più frequente. Proprio per questa multifattorialità del danno epatico nei pazienti HIV-positivi, la prevenzione ed il trattamento di ulteriori cause potenziali di danno epatico gioca un ruolo fondamentale nella gestione del paziente con coinfezione da HIV e da HBV.

L'esito della coinfezione dello stesso ospite da parte di due agenti virali in parte dipende dalle loro interazioni.

L'impatto della coinfezione da HIV sulla storia naturale dell'epatite da HBV è ancora controverso. Sebbene siano state dimostrate interazioni "in vitro" tra HBV ed HIV che potrebbero giustificare un ruolo sfavorevole della coinfezione da HBV sull'evoluzione della malattia da HIV, nessuno studio ha confermato questa ipotesi in maniera convincente.

L'epatotossicità da farmaci antiretrovirali è un fenomeno significativamente più frequente nei pazienti con epatite cronica virale [37- 45].

Questa più frequente epatotossicità è probabilmente, almeno in parte, correlabile alla riaccensione del danno da epatite virale cronica indotta dal "recupero" dei linfociti CD4 e dalla "restaurazione" di una deficiente risposta CD8, conseguenti alla soppressione della replicazione di HIV indotta dalla terapia antiretrovirale.

L'implementazione di protocolli per la gestione delle coinfezioni da virus epatite di tipo B nei pazienti sieropositivi per HIV trova pertanto le sue motivazioni:

- nell'incremento relativo della morbosità e mortalità per epatopatia osservato negli ultimi anni nei soggetti sieropositivi per HIV;
- nel ruolo giocato dalle coinfezioni da HBV come più frequente determinante di danno epatico, nei pazienti HIV positivi con storia d'esposizione a sangue e prodotti del sangue;
- nell'accelerato decorso dell'infezione da HDV nei pazienti HIV positivi.

1.10.2 Diagnosi e gestione delle epatiti croniche virali in pazienti HIV positivi

La presenza di una coinfezione da virus epatitici dovrebbe essere identificata in tutti i pazienti con infezione da HIV, che pertanto dovrebbero essere sottoposti a screening con ricerca di reattività per HBsAg e HBcAb.

I soggetti risultati HBsAg+ dovranno essere indagati e gestiti in maniera analoga a quanto prospettato per i pazienti HIV negativi. Nei pazienti con danno epatico HBcAb+ e HBsAb- dovrebbe essere ricercata la reattività per anticorpi anti-HDV (totali ed IgM) anche in assenza di HBsAg. Qualora in questi pazienti si riscontrasse importante immunodepressione potrebbe essere utile anche la ricerca di HDV RNA, test finora tuttavia a disposizione solo di laboratori di ricerca.

1.10.3 Trattamento della coinfezione HIV/HBV

1) Terapia con interferone

I dati sull'efficacia della terapia con interferone nei pazienti HIV positivi derivano per lo più da studi compiuti in era precedente l'impiego della terapia antiretrovirale di combinazione, nella maggior parte dei quali i pazienti HIV positivi erano stati inclusi perchè il test anticorpale non era ancora disponibile [46-49]. Tuttavia l'analisi di questi dati consente di affermare che la percentuale di sier conversionsi HBeAg -> anti-HBe in questi pazienti è risultata superiore a quella osservata nei pazienti non trattati o trattati con placebo (pooled rate difference +0.08 95% CI 0.067- 0.23) anche se nettamente inferiore a quella osservata nei pazienti HIV negativi (OR 0.38 95% CI 0.06-0.7). Molti dei pazienti anti-HIV positivi inclusi in questi protocolli presentavano transaminasi nella norma e quindi non è possibile definire se tale riduzione di efficacia sia correlabile esclusivamente all'infezione da HIV indipendentemente dallo stato del sistema immunitario e dall'attività necroinfiammatoria. Pertanto si può concludere che, in un paziente con CD4 superiori a 500 cell/mm³ e con transaminasi elevate, le indicazioni alla terapia con interferone rimangono le stesse poste in precedenza per i pazienti HIV negativi, fatta salva una valutazione delle possibili tossicità derivanti dall'eventuale combinazione dell'interferone con una terapia antiretrovirale.

Naturalmente il monitoraggio di alcuni parametri (conta dei neutrofili e piastrine, trigliceridi, indice di funzione epatica) deve essere più attento nei pazienti che assumono HAART ed interferone. Il trattamento con interferone è controindicato nei soggetti con riattivazione di epatite B secondaria ad immunoricostruzione.

2) Terapia con lamivudina ed altri analoghi nucleosidici-nucleotidici

Per quanto riguarda la lamivudina occorre tenere presente il suo ruolo come antiretrovirale e la possibile emergenza di ceppi virali mutati resistenti non solo per HBV ma anche per HIV [50]. Per questo motivo la lamivudina va somministrata alla dose di 150 mg due volte al giorno e non in monoterapia, ma nel contesto di una terapia antiretrovirale di combinazione seguendo le stesse indicazioni riportate per i pazienti anti-HIV negativi.

Il tenofovir inibisce la replicazione di HIV ed HBV, sia wild type che con mutazioni correlate a resistenza a lamivudina [51]. Per queste caratteristiche nel prossimo futuro potrebbe essere valutata anche l'indicazione a una terapia di combinazione tra lamivudina e

tenofovir nei pazienti HIV positivi con epatite cronica da HBV clinicamente significativa, che necessitano di terapia antiretrovirale di combinazione. Nei pazienti per i quali non è necessario prescrivere una terapia anti HIV, nel prossimo futuro sarà possibile impiegare anche adefovir alle dosi indicate nel trattamento dell'infezione da HBV ed entecavir, da soli od in combinazione. Questi farmaci non hanno indotto o non sembrano in grado di indurre mutazioni nel genoma di HIV correlabili a insorgenza di resistenza ad antiretrovirali [51].

1.10.4 Resistenza di HBV alla lamivudina in soggetti coinfecti da HBV e HIV

In corso di terapia con lamivudina, in caso di insorgenza di ceppi di HBV con mutazioni correlate a resistenza accompagnata da incremento dei livelli di HBV-DNA, il farmaco può essere continuato se persiste beneficio sulla citolisi e sulla funzionalità epatica [50]. L'aggiunta di un secondo antivirale come l'adefovir [51] o il tenofovir o ancora l'interferone deve essere valutata come opzione nei singoli casi, tenendo ben presente la necessità di monitorare accuratamente l'eventuale tossicità del nuovo farmaco, le sue interazioni con altri farmaci e l'efficacia della concomitante terapia antiretrovirale.

1.10.5 Resistenza di HIV alla lamivudina in soggetti HBsAg positivi

In un paziente HBsAg/HIV positivo che assume un regime di terapia antiretrovirale comprendente la lamivudina e che abbia un buon controllo della malattia epatica può presentarsi l'opportunità di sospendere la lamivudina in ragione della sua perdita di efficacia come farmaco anti-HIV. Prima di sospendere la lamivudina occorre tuttavia valutare lo stadio dell'epatopatia precedente l'inizio del trattamento antiretrovirale ed eventualmente mantenere la lamivudina in aggiunta al nuovo regime di terapia antiretrovirale nei casi di malattia da HBV avanzata. Comunque dopo la sospensione della lamivudina in tutti i pazienti HBsAg positivi occorre monitorare per almeno 6 mesi l'andamento degli enzimi e della funzione epatica, per identificare e trattare precocemente eventuali riattivazioni che potrebbero essere gravi [52].

1.11 Le Infezioni Occulte da HBV

L'infezione occulta da virus dell'epatite B è definita come la persistenza del genoma virale nel tessuto epatico, e in alcuni casi anche nel siero, spesso in quantità non rilevabili, in individui HBsAg negativi; è stata segnalata all'inizio degli anni '80 in pazienti con HCC, negativi per l'HBsAg [53].

Durante l'infezione occulta la carica virale è generalmente inferiore alle 10^4 copie/ml [54]. Le basi molecolari dell'infezione occulta sono strettamente correlate al caratteristico ciclo biologico di HBV. La stabilità e la lunga persistenza delle molecole di cccDNA virale, associate alla lunga emivita degli epatociti fanno sì che, una volta instauratasi, l'infezione continui per tutta la vita in maniera subclinica [55].

La ragione per cui i portatori dell'infezione occulta siano HBsAg negativi, nonostante sia presente nel loro fegato l'episoma virale, rimane ancora argomento di studio. Alcuni studi riportano come alcuni casi con infezione da varianti S di HBV producano un HBsAg modificato, non rilevabile dalle comuni tecniche diagnostiche, oppure inducano un'inibizione dell'espressione del gene S stesso. Lo stato di infezione occulta sembrerebbe principalmente causato dalla soppressione della replicazione e dell'espressione genica virale [56].

I meccanismi responsabili dell'inibizione dell'attività dell'HBV rimangono al momento poco chiari e tutte le ipotesi proposte sono basate essenzialmente su evidenze indirette. I dati disponibili indicano che la risposta immunitaria dell'ospite, le co-infezioni con altri agenti infettivi, e fattori epigenetici possono avere un ruolo importante nel causare l'infezione occulta. Per quanto riguarda la risposta immune dell'ospite, numerose evidenze mostrano che le citochine sintetizzate nel fegato, come il TNF α e l'INF γ potrebbero inibire fortemente l'espressione genica dell'HBV a livello post-trascrizionale [57].

La coinfezione con altri agenti virali potrebbe inibire la replicazione e l'espressione genica dell'HBV. Elevate prevalenze di infezione occulta da HBV sono state riscontrate in pazienti con infezione da HCV, così come studi *in vitro* hanno dimostrato una potente inibizione della replicazione HBV da parte della proteina "core" dell'HCV [58].

Non si può infine escludere che anche agenti infettivi non virali possano sopprimere l'attività dell'HBV.

Una viremia HBV molto bassa, tuttavia, non necessariamente implica che la quantità di genoma virale presente nel fegato non sia in grado di esplicare effetto patogeno. Gli studi

sulla presenza dell'infezione occulta sia nel fegato che nel siero hanno mostrato che un'alta percentuale di soggetti HBsAg negativi nel siero risultano positivi nel tessuto epatico e che la quantità dell'HBV DNA epatico è spesso paragonabile a quella di individui HBsAg positivi.

Inoltre, sebbene l'infezione occulta HBV sia significativamente associata alla presenza di anticorpi anti-HBc e, più raramente, anti-HBs, è stato osservato come in oltre il 20% dei portatori di HBV occulta si riscontrino negatività per tutti i markers sierici [59].

Al momento non sono chiare le ragioni biologiche della completa sieronegatività di questi pazienti, ma è clinicamente evidente che esistono due categorie di soggetti con infezione occulta: gli individui positivi agli anticorpi anti-HBV e, anche se in minor parte, quelli negativi per tutti i marcatori sierici per l'HBV.

La sieronegatività in questi individui potrebbe essere dovuta a mutazioni in grado di alterare sia la immunoreattività di proteine dell'HBV sia il livello quantitativo dell'HBsAg nel siero. Mutazioni dell'HBV sono associate con svariate manifestazioni cliniche, tra le quali l'epatite fulminante, la resistenza alla lamivudina e alla terapia con interferon, la selezione di escape al vaccino e bassi livelli di replicazione virale in portatori cronici [60]. Numerose mutazioni dell'HBV sono state trovate associate con l'HCC; queste mutazioni potrebbero essere implicate nel meccanismo di epatocarcinogenesi .

E' possibile che mutazioni nelle regioni S o preS del genoma virale siano selezionate come escape dalla pressione immune esercitata dall'anti-HBs e siano la causa del mancato riconoscimento dell'HBsAg da parte dei test sierologici [61].

Mutazioni per delezione nel gene preS1/preS2, che si sovrappongono al promoter S, sono state rilevate in pazienti con infezione occulta da HBV di genotipo A o D [62]. Queste mutazioni down-regolano l'espressione delle proteine di superficie, modificando il rapporto tra le proteine di superficie Large e Small, necessarie per l'assemblaggio dell'envelope virale. Ne deriva che l'assemblaggio e la secrezione dell'HBsAg sono alterate, con conseguente diminuzione quantitativa dell'HBsAg e dell'HBV nel siero.

- **Diagnosi**

L'approccio metodologico più corretto è la ricerca del DNA virale nel tessuto epatico, ottenibile con una ago biopsia che, però, non può essere eseguita come esame di routine [63]. Per questo, la maggior parte dei dati disponibili sull'infezione occulta provengono da studi effettuati su campioni ematici [64].

In commercio non sono disponibili test validi e standardizzati per lo studio dell'infezione occulta. Tra l'altro le tecniche utilizzate nei diversi lavori scientifici sono molto diverse per specificità e sensibilità e i risultati ottenuti sono spesso in contraddizione. La metodica d'elezione resta l'analisi del DNA attraverso la "nested" PCR con l'utilizzo di primers oligonucleotidici specifici per diverse regioni del genoma HBV.

- **Prevalenza e trasmissione**

L'infezione occulta HBV è diffusa in tutto il mondo, sebbene la sua distribuzione rifletta la prevalenza generale dell'HBV nelle varie aree geografiche e nelle varie popolazioni.

La presenza di virioni completi infettanti nei sieri di pazienti HBsAg negativi è stata dimostrata nella trasmissione dell'HBV-DNA per trasfusione e da madre a figlio; nella reinfezione del fegato donato dopo trapianto per cirrosi in pazienti HBsAg negativi; nell'infezione da donatori di organo HBsAg negativi.

La prevalenza dell'infezione occulta da HBV è compresa tra il 20 e il 60% mediante indagini su campioni di siero [65] e del 60-70% in campioni di tessuto epatico di pazienti con cirrosi e/o HCC, negativi per HBsAg e anti-HCV. Un'elevata prevalenza (circa il 60%) di infezione occulta da HBV è stata osservata nel fegato di pazienti con HCC associato all'HCV [66]. La persistenza del DNA virale è stata anche rilevata in soggetti senza malattia epatica. L'infezione occulta da HBV è presente nel 7-19% [67, 68] dei soggetti che risiedono in aree iperendemiche in cui il 70-90% della popolazione è stata esposta all'HBV e nello 0-9% [69] dei soggetti che risiedono in aree a bassa endemia, in cui il 5-20% della popolazione è stato esposto all'HBV.

Gli individui con infezione da HCV sono la categoria a maggior prevalenza di epatite B occulta. L'HBV DNA è rilevabile in circa un terzo dei soggetti HCV positivi e HBsAg negativi nel bacino del Mediterraneo e questa prevalenza è ancor più alta nei Paesi dell'Est asiatico. Gli studi condotti su pazienti in emodialisi e su individui HIV positivi forniscono dati discordanti con tassi che vanno dallo 0% al 36% per i primi e dallo 0% all'89% per i secondi. Le discrepanze sembra dipendano dalla diversa sensibilità e specificità dei test utilizzati nei diversi studi [70].

I portatori di infezione occulta potrebbero rappresentare una fonte di trasmissione di HBV attraverso le trasfusioni di sangue. L'infezione HBV occulta potrebbe inoltre essere trasmessa durante i trapianti di organo, in particolare nel caso di trapianto ortotopico di fegato (OLT), poiché gli epatociti sono un serbatoio del virus attivo.

- **Riattivazione dell'infezione B occulta**

Lo stato di soppressione della replicazione virale e dell'espressione genica tipico dell'infezione occulta da HBV potrebbe non essere costante e potrebbe portare allo sviluppo di una tipica epatite B acuta che spesso ha un decorso clinico severo e, raramente, fulminante. Questo evento si è spesso osservato in individui con una condizione di immunosoppressione indotta da terapie e/o correlata a malattie che coinvolgono il sistema immunitario [71].

Infatti, per la mancanza del controllo immunologico, i portatori di infezione occulta possono mostrare una riattivazione della replicazione virale e, una volta ricostituita la sorveglianza immunitaria, il danno degli epatociti mediato dai linfociti T citotossici può portare allo sviluppo di un'epatite rapidamente progressiva.

L'identificazione precoce di una riattivazione virologica permetterebbe di iniziare una terapia antivirale specifica. L'infezione occulta potrebbe favorire o accelerare la progressione della patologia epatica cronica in individui affetti da HCV in una sorta di sinergismo come molti studi suggeriscono [72-74].

L'infezione occulta sembra indurre anche resistenza alla terapia antivirale con interferone. L'infezione occulta HBV è un fattore di rischio per lo sviluppo dell'epatocarcinoma [75-77], soprattutto in pazienti HCV positivi nei quali la terapia per eradicare il virus è stata inefficace [78].

La lunga persistenza del virus negli epatociti, induce una lieve ma persistente necroinfiammazione epatica che, in concomitanza con altre cause di danno epatico, potrebbe favorire o accelerare la progressione verso la cirrosi e l'epatocarcinoma in pazienti HBsAg negativi, attraverso gli stessi meccanismi ontogenetici dell'HBV nell'infezione manifesta [79].

1.12 L'infezione da HBV e la coinfezione HIV/HBV in Africa

I Paesi in via di sviluppo e del terzo mondo, quali la Cina, il Sud Est Asiatico, le regioni del Pacifico e l'Africa Sud-Sahariana, sono aree dove l'Epatite B è endemica, con elevata prevalenza nella popolazione: l'infezione è frequente nei bambini, che presentano spesso marcatori sierologici di infezione pregressa o cronica, e nella popolazione adulta, dove la frequenza di portatori di HBsAg supera, in molte zone, il 10%. Queste aree mostrano elevati tassi di trasmissione materno-fetale, con elevata mortalità per cirrosi ed epatocarcinoma HBV-correlati. Questa via di trasmissione origina così un elevato numero di individui con infezione/malattia cronica, potenzialmente in grado di trasmettere il virus. [80].

Precedenti studi effettuati in Sud Africa su donne in gravidanza HBV-infette non hanno individuato nella trasmissione perinatale la modalità più rilevante di infezione nei bambini. Tale modalità di trasmissione risulta invece più frequente nelle donne con co-infezione HIV/HBV [81]. L'immunosoppressione correlata ad HIV aumenta infatti la replicazione virale e, di conseguenza, la carica virale di HBV e la possibilità di trasmissione. Nel contesto africano, così gravemente colpito dalla pandemia HIV, la co-infezione HIV/HBV comporta un aumentato rischio di trasmissione per via verticale/perinatale di HBV.

In queste aree le donne gravide non sono regolarmente sottoposte a screening per HBsAg e la vaccinazione anti-epatite B per i neonati, quando prevista, viene somministrata a partire dalle 6 settimane di vita, rendendo molto probabile la trasmissione perinatale. Inoltre, le immunoglobuline anti-epatite B da somministrare ai bambini nati da madri coinfezionate da HIV/HBV sono molto costose e non disponibili presso le strutture ospedaliere pubbliche. Per questi motivi, la valutazione dell'effettiva diffusione della co-infezione HIV/HB nell'Africa Sub-Sahariana appare necessaria per poter prendere in considerazione misure preventive maggiormente idonee, quale l'adeguamento del calendario vaccinale, con anticipo della vaccinazione anti-epatite B alla nascita, procedura del resto già in atto in numerosi altri Paesi [82, 83].

1.13 La situazione sanitaria in Malawi e i dati relativi all'infezione da HBV

In Malawi vivono 13.571.000 persone e l'aspettativa di vita è di 49 anni per gli uomini e di 51 anni per le donne. Il tasso di mortalità per i bambini al di sotto dei 5 anni è di 120 bambini ogni 1000 nati vivi mentre quello per la popolazione adulta all'interno del range di età 15-60 anni è di 554 persone ogni 1000 abitanti [1].

A partire dal 1985, quando fu identificato il primo caso di infezione da HIV, si stima che circa 650.000 malawiani siano morti a causa di patologie correlate ad HIV.

Secondo UNAIDS la stima del numero di persone viventi in Malawi con HIV/AIDS nel 2009, si attestava attorno ad un valore di 920.000 persone. La prevalenza dell'infezione tra gli adulti in fascia di età 15-49 anni era pari all'11 % e approssimativamente 650.000 bambini hanno perso uno o entrambi i genitori a causa dell'AIDS.

La maggioranza della popolazione vivente con infezione da HIV sono donne, che sono stimate essere il 58 % degli 800.000 adulti HIV positivi presenti nel paese [84].

Ad oggi i dati riguardanti la reale prevalenza dell'infezione da HBV in Malawi sono esigui e non è nota la frequenza della co-infezione HIV/HBV. Studi effettuati in alcune regioni del Paese hanno rilevato una prevalenza di portatori di HBV in una popolazione di donne gravide pari al 13% [85]. Uno studio condotto nella regione montana di Ntcheu, in Malawi, ha dimostrato attraverso uno screening sierologico l'elevata endemicità delle infezioni da HIV e HBV con una prevalenza di portatori pari all'8% e una frequenza di co-infezioni da HIV/HBV pari all'1,2% rispetto alla popolazione studiata [86].

Il genotipo di HBV prevalente in Malawi è il genotipo A, in particolare il sottogruppo A1 è stato evidenziato al sequenziamento in diversi isolati virali. Sono stati identificati come circolanti i sottotipi *adw2* e *ayw2* [87, 88]

Uno altro studio condotto su pazienti ricoverati al Queen Elizabeth Hospital di Blantyre, il più grande ospedale del Paese, ha evidenziato un elevato tasso di co-infezione HIV/HBV (20,4%) tra i pazienti presi in esame e una frequenza di portatori di HBV pari al 17,5%. Questi dati potrebbero avere un impatto sul trattamento con terapia antiretrovirale per i pazienti HIV positivi affetti da co-infezione con HBV. [89]

Lo studio più recente condotto in Malawi ha fornito un dato di frequenza di co-infezione HIV-HBV pari al 6,7% in una coorte di pazienti arruolati in programmi di terapia ART. Questo studio non ha rilevato un'associazione tra la presenza di co-infezione HIV-HBV e l'insorgenza di epatotossicità, mortalità o fallimento virologico legati alla terapia [90]

Ad oggi non esistono dati relativi alla frequenza di infezione occulta da epatite B in Malawi. Lo studio di quest'ultima risulta importante ai fini dell'introduzione nel contesto africano di metodiche molecolari che ne consentano l'identificazione. Attualmente la diagnosi di infezione da HBV viene effettuata in Malawi solo per pazienti sintomatici che accedono alle maggiori strutture sanitarie del paese. Solitamente l'infezione da HBV è diagnosticata quando il marcatore sierologico HBsAg circolante è rilevato. Tuttavia l'avvento di tecniche di biologia molecolare ha permesso di indentificare l'infezione occulta da HBV anche in soggetti negativi per HBsAg con o senza anticorpi circolanti anti-HBc e/o anti-HBs. Risultano pertanto prioritari studi atti a valutare l'attuale impatto epidemiologico, clinico e terapeutico dell'infezione da HBV in pazienti HIV positivi, soprattutto nell'ottica di migliorare strategie di intervento all'interno di programmi di lotta all'AIDS già attivi in Africa. Il programma DREAM avviato in numerosi Paesi africani dalla Comunità di Sant'Egidio (Roma) è uno di questi ed opera in Malawi dal 2005.

1.14 DREAM (Drug Resource Enhancement against AIDS and Malnutrition)

La Comunità di Sant'Egidio (movimento di laici cattolici nata nel 1968 a Roma) è una ONG (Organizzazione non Governativa) con centro a Roma, attiva in tutti I continenti con programmi di cooperazione allo sviluppo, di sostegno ai diritti umani, di facilitazione di processi di pace e riconciliazione.

DREAM (*Drug Resource Enhancement against AIDS and Malnutrition*) è un programma di controllo, prevenzione, trattamento, in altre parole di lotta globale, all'infezione da HIV nei Paesi a risorse limitate avviato dalla Comunità di Sant'Egidio in vari Paesi africani ed operativo sul campo dal marzo 2002.

Per la Comunità di Sant'Egidio è centrale il valore della persona e di ogni vita. Per lunghi anni una strategia esclusivamente preventiva è stata il paradigma di tutte le grandi agenzie internazionali – e della comunità scientifica – per l'attacco all'AIDS nei Paesi in via di sviluppo. Questa strategia ha mostrato i suoi limiti: decine di milioni di africani sieropositivi e una curva dell'epidemia drammaticamente in ascesa almeno fino al 2010 impongono uno sforzo straordinario per recuperare il tempo perduto e affiancare alla prevenzione, finalmente, la terapia. Pena il fallimento dell'intera strategia di lotta all'AIDS nel Sud del mondo e la scomparsa di gran parte dell'Africa di oggi e di domani. Il programma nasce dunque con l'obiettivo di tornare a riunire prevenzione e terapia, nella convinzione che è necessario salvare oltre che prevenire, guadagnando per quante più persone possibile un nuovo tempo alla vita.

DREAM è concepito per l'eccellenza. Eccellenza delle cure e della diagnostica, dell'organizzazione e dell'informatizzazione. Per questo, come verrà illustrato nelle pagine che seguono, DREAM ripropone lo stato dell'arte degli standard occidentali, utilizzando di routine la valutazione della carica virale, o introducendo la *Highly Active Anti-Retroviral Therapy* (HAART), l'attuale *golden standard* nel trattamento dell'infezione da HIV, per tutti i pazienti che ne hanno bisogno. Il progetto DREAM si muove secondo quel semplice e antico segreto che raccomanda di fare agli altri ciò che vorremmo fosse fatto a noi stessi. Chi non vorrebbe per se stesso l'eccellenza? Questo approccio ha una sua profonda efficienza. È di grande motivazione per il personale coinvolto, raccoglie il massimo di collaborazione dei pazienti, rende promotori di conoscenze nell'ambiente circostante i pazienti stessi, abbatte la dispersione e l'interruzione della terapia in atto, alza il livello qualitativo delle prestazioni offerte. Il minimalismo tante volte proposto in tema di aiuto

internazionale e di cooperazione rischia, sul tema dell'AIDS, di condurre a conseguenze pericolose se non addirittura letali in un ambiente già esposto a troppe debolezze e a fronte di una complessità che è in radice refrattaria a ogni approccio settoriale o riduttivo.



Nell'ottobre 2001 il programma DREAM iniziava le sue attività, finalizzate alla cura delle persone viventi con HIV/AIDS, aprendo il primo servizio di assistenza domiciliare e *day hospital* in un sobborgo di Maputo, capitale del Mozambico. Avvalendosi della consulenza di specialisti del settore erano stati messi a punto i protocolli di cura con farmaci

antiretrovirali, da utilizzare per il trattamento dei malati e la prevenzione della trasmissione materno infantile.

Si trattava infatti di adattare alla realtà particolare di un paese a risorse limitate come è, appunto, il Mozambico, quelle indicazioni clinico-farmacologiche già sperimentate in USA ed in Europa e che avevano modificato completamente la storia naturale della malattia dal 1996 in poi, riducendo enormemente la mortalità dei pazienti anche nelle fasi più avanzate dell'infezione.

La somministrazione dei farmaci antiretrovirali ai pazienti è iniziata nel febbraio 2002, quando i farmaci stessi sono diventati realmente disponibili in Mozambico.

I protocolli terapeutici messi a punto hanno cercato di tener conto dei problemi posti dal contesto nel quale ci si è trovati a operare:

- la prospettiva dell'uso di farmaci generici in combinazioni fisse di tre principi attivi all'interno della stessa compressa: se limita la varietà dei medicinali e degli schemi terapeutici utilizzabili rispetto al range disponibile in Occidente, al tempo stesso può rappresentare un'importante chance di semplificazione della terapia e di miglioramento della *compliance*;
- la prevalenza elevata di condizioni patologiche come la infezione HIV/TB, la malaria o la semplice anemia su base carenziale, che condizionano le scelte terapeutiche;
- la percentuale di donne in età fertile tra gli infetti (oltre il 50% dei candidati alla terapia), che pone ulteriori condizionamenti alle scelte terapeutiche in relazione a possibili gravidanze;
- la necessità di contemperare nello stesso tempo elevati standard nella gestione del paziente e contenimento dei costi (ad esempio per la diagnostica di laboratorio);
- il problema delle profilassi per le infezioni opportunistiche (quali, quante, per quanto tempo, come evitare eccessive difficoltà nell'assunzione della terapia);
- la necessità frequente di un supporto nutrizionale che accompagni la terapia, soprattutto nelle donne in gravidanza [91-93].

Queste sono solo alcune delle domande che hanno accompagnato la messa a punto dei protocolli che rappresentano (pur essendo ovviamente perfezionabili ma ad oggi confortati da risultati spettacolari) un primo, importante contributo alla lotta all'AIDS nei Paesi in via di sviluppo.

La pubblicazione nell'aprile 2002 da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità del documento dal titolo "*Scaling up Antiretroviral treatment in limited resource setting*" ha

rappresentato un punto di non ritorno nel dibattito sull'accesso alle cure per le persone con HIV/AIDS in Africa [93]. Questo documento ha rappresentato un punto di riferimento teorico. È venuto in molti casi a confermare gli indirizzi che DREAM aveva già assunto, e ha arricchito ulteriormente di spunti la riflessione sul trattamento per le persone viventi con HIV/AIDS in Africa. Obiettivi del documento dell'OMS erano:

- incrementare l'uso degli antiretrovirali per venire incontro alle necessità delle persone viventi con HIV/AIDS in paesi a risorse limitate;
- standardizzare e semplificare la terapia antiretrovirale per permetterne una facile e larga diffusione;
- assicurare che il trattamento sia basato sulle evidenze scientifiche disponibili, per evitare che l'uso di protocolli lontani dai migliori standard clinico-terapeutici possa provocare danni ai singoli pazienti e favorire l'emergere di ceppi resistenti.

Nello stesso documento l'OMS indicava nei programmi di sanità pubblica la cornice più adatta a realizzare gli obiettivi proposti. Insieme a questo documento, le linee guida per l'uso della terapia antiretrovirale in Europa e negli USA ed un'ampia disamina della letteratura scientifica più recente, hanno costituito il *background* scientifico dell'elaborazione dei protocolli di DREAM.

Criteri di inclusione nel protocollo di trattamento

Ancora oggi quando iniziare il trattamento antiretrovirale è una questione aperta. Mentre esiste un generale consenso sul trattare i pazienti con meno di 200 CD4+/mm³, oppure con sintomi evidenti di malattia [94, 95], non altrettanto si può dire per i pazienti asintomatici con CD4+ superiori a 200. Va tuttavia sottolineato come la diffusione di malattie infettive potenzialmente mortali, anche in assenza di immunocompromissione, sia certamente maggiore in Africa che non in Europa o negli USA. Si pensi soltanto alla malaria che costituisce una delle principali cause di morte sia nei pazienti HIV positivi che in quelli HIV negativi [96]. D'altra parte, la percentuale di soggetti con CD4+ compresi tra 200 e 350, che progrediscono verso l'AIDS in tre anni, è pari al 38,5% con punte di oltre il 60% in presenza di cariche virali superiori a 55.000 copie/ml⁷. Queste considerazioni sembrano giustificare la scelta di un approccio aggressivo nel trattamento, che nel caso di DREAM è stato identificato con l'offerta di terapia antiretrovirale estesa anche ai pazienti con CD4+ compresi tra 200 e 350 e carica virale superiore a 55.000 copie/ml (Tabella 3).

			Linee-guida in uso in USA e UE	Linee-guida OMS per LRS*	Protocollo DREAM
Classificazion e clinica OMS	Conteggio dei CD4+	Carica Virale			
Stadio III – IV	Qualsiasi valore	Qualsiasi valore	Trattamento	Trattamento	Trattamento
Stadio I-II	< 200	Qualsiasi valore	Trattamento	Trattamento	Trattamento
Stadio I-II	200-350	Qualsiasi valore	Trattamento/ Osservazione	osservazione	Trattamento/ osservazione
Stadio I-II	> 350	>55.000	Trattamento/ Osservazione	osservazione	Trattamento/ Osservazione
Stadio I-II	>350	<55.000	Osservazione	Osservazione	Osservazione

*Tabella 3: Criteri di inclusione nel protocollo di trattamento con farmaci ARV (*LRS: Limited Resource Setting, Paesi a risorse limitate).*

Gli schemi terapeutici

Nell'individuazione dei protocolli terapeutici da offrire ai pazienti, sono stati presi in considerazione diversi aspetti che vengono qui di seguito analizzati in un ordine non gerarchico.

Il primo di essi è la scelta delle combinazioni farmacologiche da usare. Da questo punto di vista le possibilità sono molte, fatta salva la decisione di utilizzare solo combinazioni con almeno tre farmaci, che rappresentano oggi *il golden standard* dell'approccio terapeutico al paziente con HIV/AIDS.

Svariati *trial* clinici hanno messo in evidenza la sostanziale equivalenza, in termini di potenza antivirale, di differenti regimi terapeutici [97-105].

Il secondo aspetto è quello della necessaria semplicità di somministrazione, unitamente alla necessità di utilizzare farmaci registrati nei Paesi e possibilmente disponibili a costi contenuti, quali i generici. Tutti questi elementi restringono molto il campo delle possibili scelte. L'aderenza alla terapia prescritta ha sempre rappresentato una delle principali

preoccupazioni rispetto all'implementazione del trattamento in Africa, a causa della relativa facilità con la quale errori nell'assunzione delle medicine possono favorire l'emergere di ceppi resistenti. In molti hanno ritenuto proprio per questo, oltre che per gli alti costi e le debolezze strutturali dei sistemi sanitari, che la terapia dei pazienti con HIV/AIDS fosse sconsigliabile o impossibile. Non c'è dubbio che l'aderenza dei pazienti alla terapia è sempre stata un punto cruciale in grado di condizionare l'efficacia dei trattamenti, anche nei paesi dove i farmaci sono sempre stati disponibili.

La disponibilità di preparazioni farmacologiche che riuniscono in una singola compressa tre farmaci, che corrispondano ad uno degli schemi terapeutici testati come efficaci, costituisce un elemento di grande rilevanza ai fini di una migliore aderenza alla terapia e della riduzione dei rischi di emergenza di resistenze agli antiretrovirali. Infatti da una parte si ottiene una notevole semplificazione della terapia, che viene ridotta a due compresse al giorno dalle 10 -15 che mediamente assume, ad esempio, un paziente europeo; dall'altra, in caso di interruzione di terapia, lo stop riguarda necessariamente tutti e tre i farmaci contemporaneamente. Si aggiunga a questo, ed è il terzo punto da prendere in considerazione, che tali preparazioni sono fornite a prezzi mediamente inferiori venti volte a quelli che gli stessi schemi terapeutici hanno in Europa o negli Stati Uniti, con un risparmio per persona di oltre il 95%. I due schemi terapeutici di base individuati come prime linee di trattamento sono:

- 1) zidovudina(AZT) 300mg – lamivudina(3TC) 150mg – nevirapina(NVP) 200mg
- 2) stavudina(d4T) 30 o 40mg – lamivudina 150mg – nevirapina 200 mg.

Il costo annuo per persona di questi due schemi terapeutici è oggi pari a circa 330 USD. La scelta fra questi due schemi terapeutici è definita da un elemento frequentemente presente nei pazienti HIV, in special modo quelli africani che vivono in zone ad alta endemia di malaria: l'anemia. Una concentrazione di emoglobina inferiore ad 8 g/dl indirizza verso l'uso della stavudina. Nel caso invece di una concentrazione emoglobinica superiore o della presenza di neuropatia periferica verrà preferito lo schema con la zidovudina. Esiste una terza possibilità rappresentata dalla compresenza di neuropatia periferica ed anemia. Questo caso, in realtà infrequente nella nostra esperienza clinica ma non impossibile, richiede l'utilizzo di un ulteriore schema terapeutico che includa abacavir(ABC) – didanosina(ddI) – nevirapina, per il quale non esistono al momento preparazioni farmacologiche simili a quelle prese in considerazione negli schemi

precedenti. Un ulteriore elemento che condiziona la scelta dei farmaci, anche nel caso di inizio trattamento, è la presenza della tubercolosi.

Considerata però la forte presenza dell'anemia nella popolazione generale africana lo schema terapeutico più indicato appare senza dubbio quello con stavudina-lamivudina-nevirapina. All'interno di questo protocollo di intervento le alternative, in caso di fallimento terapeutico, sono più numerose rispetto a quelle disponibili per lo schema che include la zidovudina. Infatti anche l'uso dell'abacavir in pazienti resistenti al trattamento con zidovudina e lamivudina è limitato dalla frequente resistenza crociata [93].

L'alternativa all'uso della nevirapina, cioè l'efavirenz (EFV), appare poco indicata per i potenziali effetti teratogeni di questo farmaco, che sarebbe usato in una popolazione di pazienti, per oltre il 50% donne, praticamente tutte in età fertile

e con scarsissima attitudine all'uso dei contraccettivi. Inoltre l'uso dell'efavirenz solleva ulteriori perplessità se si considerano le problematiche specifiche legate alla sua farmacocinetica, caratterizzata da un'emivita più lunga di quella degli altri farmaci, che richiede particolari attenzioni nella somministrazione o nella sospensione [93-95].

Analogo motivo sconsiglia l'uso della coppia stavudina-didanosina, se non in assenza di alternative terapeutiche, in considerazione delle segnalazioni in letteratura di alcuni decessi in donne in stato di gravidanza

che avevano utilizzato questi farmaci per tutto il corso della gravidanza stessa [106].

Infine l'uso degli inibitori delle proteasi (IP) appare più indicato in schemi di seconda linea in considerazione della maggiore difficoltà dovuta ad un aumentato numero di compresse da assumere quotidianamente (non esistono, infatti, combinazioni di farmaci in un'unica compressa che comprendano gli inibitori). In futuro la disponibilità di schemi terapeutici che richiedono una sola somministrazione giornaliera, potrà modificare l'attuale protocollo.

La sicurezza: i farmaci utilizzati sono tra i primi impiegati nella lotta all'infezione da HIV, e quindi tra i più conosciuti. L'incidenza di effetti collaterali o di reazioni avverse non è elevata (fatta eccezione in parte per la nevirapina) e la loro tossicità, nella maggior parte dei casi, è diluita nel tempo tanto da consentirne la rilevazione anche con controlli periodici non estremamente ravvicinati [107-109]. Questo elemento va tenuto presente in paesi dove gli spostamenti non sono né rapidi né semplici ed il contatto con i pazienti è potenzialmente più rarefatto che non in altre realtà. Per quanto riguarda le seconde linee di trattamento la scelta dipende dal motivo che costringe a rivedere lo schema terapeutico

iniziale. I motivi possono essere sostanzialmente due: allergie-intolleranze di vario tipo e fallimento terapeutico.

1) *Allergia-intolleranza-effetti avversi riconducibili ad uno dei farmaci inclusi nella prima linea di trattamento.* Nel caso si tratti della nevirapina la si può sostituire con un inibitore delle proteasi (ad esempio l'indinavir IDV o il nelfinavir (NFV) oppure con un terzo NsRTI (dall'acronimo anglosassone di Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor) quale ad esempio l'abacavir [93].

2) *Fallimento terapeutico.* La definizione di fallimento terapeutico è clinica (sviluppo di patologie AIDS-correlate dopo assunzione di terapia antiretrovirale per un periodo congruo a restaurare la funzione immunitaria), immunologica (caduta del 30% del numero dei linfociti CD4+ o ritorno al livello dei CD4+ pre-terapia), o virologica (carica virale presente dopo 6 mesi di terapia oppure, per i pazienti con più di 500.000 copie prima della terapia, carica virale superiore alle 10.000 copie dopo 6 mesi di terapia) [93]. Va tuttavia sottolineato che esiste una certa variabilità dei parametri immunologici e virologici il cui andamento va comunque valutato nel tempo, senza lasciarsi condizionare in maniera immediata da un solo risultato. Ciò detto, in presenza di condizioni cliniche stabili, la valutazione finalizzata al cambiamento della terapia richiede che siano stati condotti almeno 6 mesi di trattamento. In questo caso è suggerito il cambiamento totale della terapia: le alternative possibili coinvolgono la coppia zidovudina-didanosina associata all'indinavir (o al nelfinavir) se lo schema iniziale era stavudina-lamivudina-nevirapina. Se invece lo schema iniziale comprendeva la zidovudina l'alternativa diventa la triade didanosina-stavudina-indinavir (Tabella 4) [93].

La resistenza ai farmaci antiretrovirali rappresenta una minaccia sostanziale per il futuro della terapia anti-HIV, anche a causa della frequente resistenza crociata tra i diversi farmaci. Certamente questo, pur essendo un elemento da prendere in considerazione per l'importanza che ha assunto nel tempo nei paesi occidentali, non può costituire una ragione per rallentare la diffusione della terapia in Africa. Allo stesso tempo, tuttavia, l'implementazione di sistemi che limitino lo sviluppo di resistenze crociate, va presa in considerazione così come avviene nei paesi occidentali. La possibilità di modificare rapidamente il trattamento al manifestarsi dei primi segni di fallimento terapeutico, cioè prima che le mutazioni alla base delle resistenze agli antiretrovirali siano completamente sviluppate, rappresenta il criterio principale per ridurre il numero di opzioni terapeutiche successivamente inutilizzabili.

Per quanto riguarda le profilassi delle infezioni opportunistiche, l'unica inserita nel protocollo è la somministrazione di co-trimoxazolo quotidiana per sei mesi nei pazienti con meno di 200 CD4+ all'arruolamento. Non si ritiene infatti opportuno procedere ad altre forme di profilassi sistematica data anche la scarsità di informazioni dettagliate sulla prevalenza delle infezioni opportunistiche nei malati di AIDS in Africa sub-sahariana.

L'impianto del protocollo terapeutico che emerge da queste considerazioni appare molto semplice e piuttosto omogeneo. Va tenuto conto del fatto che i candidati al trattamento sono in maggioranza dei casi persone che non sono state sottoposte ad altre terapie antiretrovirali precedentemente. Di conseguenza, l'efficacia è potenzialmente superiore a quella che gli stessi trattamenti hanno avuto tra i pazienti europei o nordamericani che venivano, nella maggior parte, da numerose esperienze con schemi terapeutici rivelatisi sub-ottimali. Tale efficacia si vede già dai primi risultati del trattamento nelle coorti di pazienti africani che hanno avuto la possibilità di riceverlo [110-112]. L'omogeneità e la diffusione su larga scala dei trattamenti appare anche come una possibilità ulteriore di contrastare l'emergere di resistenze proprio perché i pazienti tendono ad assumere quasi sempre gli stessi farmaci.

Prima scelta	Seconda scelta per allergie/effetti avversi	Seconda scelta per fallimento terapeutico
d4T – 3TC – NVP	d4T – 3TC – IDV d4T – 3TC – NFV d4T – 3TC – ABC AZT – 3TC – NVP	AZT – ddI – IDV AZT – ddI – NFV ddI – ABC – IDV ddI – ABC – NFV
AZT – 3TC – NVP	AZT – 3TC – IDV AZT – 3TC – NFV AZT – 3TC – ABC d4T – 3TC – NVP	ddI – d4T – IDV ddI – d4T – NFV ddI – ABC – IDV ddI – ABC – NFV

Tabella 4: Schemi terapeutici inclusi nei protocolli di DREAM

La cura della madre e la prevenzione della trasmissione verticale

Se la terapia nelle persone con HIV/AIDS ha l'obiettivo di contrastare il progredire dell'infezione, nelle donne con HIV in stato di gravidanza ha anche l'obiettivo di evitare la trasmissione del virus al feto. In questo senso la carica virale assume, se possibile, un valore ancora più rilevante. Infatti rappresenta l'elemento chiave che condiziona il rischio di infezione del feto da parte della madre anche se evidentemente non è l'unico. A parità di carica virale, infatti, vi sono diversi fattori di rischio per la trasmissione dell'HIV dalla madre al bambino. Tra questi la malnutrizione, la presenza di ulcere genitali, di Malattie a Trasmissione Sessuale (MTS), la rottura prolungata delle membrane, le lacerazioni vaginali, e poi, successivamente al parto, l'allattamento [93, 113-119]. Sono tutti elementi che vanno presi in considerazione e sui quali, se possibile, bisogna intervenire. È necessario abbattere la carica virale a meno di 1000 copie/ml per ridurre il rischio di trasmissione in maniera consistente [91]. In presenza di un trattamento altamente efficace come è la tri-terapia si può pensare di ottenere una riduzione media di carica virale pari ad un log per mese di terapia [112]. Ciò comporta la necessità di una durata media del trattamento pre-parto non inferiore a due mesi per avere la ragionevole certezza di scendere sotto le 1.000 copie/ml. Un altro elemento da tenere in considerazione nel disegnare il protocollo terapeutico di prevenzione della trasmissione materno infantile è la tendenza al parto prematuro tipica delle donne HIV-positive. Tenuto conto di tutto ciò si è ritenuto di dover iniziare la terapia per tutte le donne alla 25a settimana. Per le donne che al momento dell'arruolamento avessero un conteggio dei CD4+ inferiore a 200/mm³, o una carica virale superiore alle 55.000 copie/ml (bDNA 3.0), o la cui situazione clinica corrispondesse al 3° livello del *WHO clinical staging system*, la terapia viene iniziata prima della 25a settimana, ma sempre dopo la 14a settimana di gravidanza (Tabella 5). La scelta del trattamento risponde a criteri analoghi per molti aspetti a quelli già illustrati per gli adulti/adolescenti. Lo schema di scelta in questo caso è zidovudina-lamivudina-nevirapina per la maggiore esperienza relativa all'uso di questi tre farmaci in gravidanza [91]. Nelle donne con meno di 8 g/100 ml di emoglobina si preferisce l'uso della stavudina. La stavudina è stata implicata in tre casi di decesso di donne in gravidanza per acidosi lattica; in tutti e tre i casi la paziente aveva assunto stavudina dall'inizio della gravidanza ed in associazione con didanosina [106]. Sono stati segnalati altri casi di acidosi lattica in gravidanza anche con altri farmaci della NsRTI in associazione o meno con stavudina, ma

non mortali [93, 106, 120]. L'acidosi lattica va considerato un evento raro ma possibile in donne in gravidanza trattate con questo tipo di farmaci. Tuttavia la rarità dell'evento fa ritenere ingiustificata l'esclusione della stavudina dall'armamentario a disposizione per la prevenzione della trasmissione materno-infantile, fatta eccezione per la sua associazione con la didanosina, che va evitata se non in assenza di alternative[121-123].

Tipologia paziente	Stadio 3 - 4§	Stadio 1 - 2§	Stadio 0+
Prima del parto	<u>II Trimestre</u> AZT 300 mg 2/die 3TC 150 mg 2/die NVP* 200 mg per 13 gg e dopo 400 mg/die	<u>25a settimana</u> AZT 300 mg 2/die 3TC 150 mg 2/die NVP* 200 mg per 13 gg e dopo 400 mg/die <i>Se CD4+ <200 o carica virale >55.000 vedi stadio 3-4</i>	
Al parto	Continuano la terapia in atto	Continuano la terapia in atto	AZT 600 mg + 300 mg 8/die 3TC 150 mg 2/die NVP 200 mg per 13 gg e dopo 400 mg/die
Dopo il parto	<u>Bambino:</u> Nevirapina 2mg/Kg/die entro 48-72 ore dal parto <u>Madre:</u> Continua la terapia in atto	<u>Bambino:</u> Nevirapina 2mg/Kg/die entro 48-72 ore dal parto <u>Madre:</u> Continua la terapia in atto. per 30 gg fino a scomparsa della montata latte. Dopo segue il protocollo per il trattamento	<u>Bambino:</u> Nevirapina 2mg/Kg/die entro 48-72 ore dal parto <u>Madre:</u> Riclassificazione in uno degli stadi precedenti

Tabella 5: Schemi terapeutici per la prevenzione della trasmissione verticale (§ Nelle pazienti anemiche (Hb<8) AZT sostituito con d4T: 30 mg 2/die per peso corporeo inferiore a 60 Kg; 40mg 2/die per peso corporeo superiore a 60 Kg. A tutte le puerpere verrà consigliato l'allattamento artificiale; *In caso di intolleranza la NVP sarà sostituita dall'indinavir o dal nelfinavi; +Donne visitate per la prima volta al momento del parto)

Durante la gravidanza la gestante riceve un sostegno nutrizionale (riso, fagioli, olio, zucchero) ed un supplemento polivitaminico, con l'obiettivo di contrastare la malnutrizione e l'anemia, ridurre la quota di parti prematuri (vitamina A) e l'incidenza quali-quantitativa del basso peso alla nascita. Inoltre, considerando lo stress costituito dall'infezione da HIV dal punto di vista proteo-energetico per l'organismo, la supplementazione assume un ruolo centrale nel sostenere la lotta al virus [124-127].

Entro le 72 ore successive al parto il neonato riceve una dose di Nevirapina sciroppo con l'obiettivo di proteggerlo nel momento di maggiore vulnerabilità nel caso di allattamento naturale. Il trattamento farmacologico viene continuato a dosi piene dopo il parto nelle donne che all'arruolamento corrispondevano ai criteri di terapia individuati dal programma DREAM. Nel caso questa condizione non sussistesse, la terapia viene sospesa a distanza di sei mesi dal parto, dopo un programma di svezzamento che aiuti la donna ad introdurre alimenti adeguati per il bambino e che consenta di accertarsi che abbia perso il latte.

Il trattamento viene prolungato di 6 mesi dopo il parto per consentire alla donna di allattare al seno durante questo periodo. Recenti studi, condotti proprio dal programma DREAM sui pazienti in trattamento in Mozambico, dimostrano infatti che in donne in trattamento la carica virale nel latte è costantemente non rilevabile, mentre la quantità di farmaco residuale che il bambino assume con il latte materno, pur essendo in quantità subottimale, non è rilevante. Il fatto di consentire, alle donne che lo desiderano, di poter allattare naturalmente, per la sua semplicità, accettabilità, e per l'insostituibile valore protettivo del latte materno, costituisce un ulteriore elemento di forza del programma.

Tuttavia, alle madri che per diversi motivi non possono allattare al seno, vengono create le condizioni di un allattamento sicuro. Alle donne viene fornito un filtro per l'acqua (ceramica e carbone attivo), un biberon e, periodicamente, il quantitativo di latte artificiale necessario al bambino.

Brevi corsi di educazione sanitaria durante la gravidanza ed un'istruzione individuale al momento del parto hanno l'obiettivo di favorire l'allattamento artificiale. La madre continua a ricevere sostegno alimentare e vitaminico durante il periodo post-partum. Dal 4° - 6° mese inizia lo svezzamento del bambino che si conclude intorno al dodicesimo mese [128].

Salvare il futuro dell'Africa

La cura delle madri è una delle peculiarità del modello proposto attraverso DREAM. L'offerta della terapia antiretrovirale alle madri con l'obiettivo di curarle anche dopo il parto è fondamentale. È il solo modo per prevenire l'aumento esponenziale degli orfani. Gli orfani dell'HIV sono già stimati in circa 14.000.000 dei quali 11 milioni vivono in Africa sub-sahariana. Essere orfani in Africa non è semplicemente una condizione sfavorevole dal punto di vista umano e psicologico. È un fattore di rischio. Rischio di morire più facilmente degli altri bambini. Rischio di non andare a scuola perché la famiglia non ce la fa a garantire il necessario per l'iscrizione. La percentuale di bambini che frequenta la scuola tra gli orfani scende mediamente di circa due terzi in Africa australe. La scelta di DREAM di offrire alle madri contemporaneamente la prevenzione per la trasmissione madre-figlio e la cura per la propria malattia ha anche l'effetto di assicurare una migliore aderenza al programma. Affinché i progetti di prevenzione funzionino è necessario diffondere tra la gente, ed in primo luogo tra le donne, il desiderio di lottare contro l'AIDS e soprattutto la speranza che questa lotta si può vincere. Oggi che tutto questo è possibile a costi relativamente contenuti, la cura delle madri, oltre ad essere un imperativo etico, è anche una scelta di buon senso.



1.14.1 Il laboratorio di biologia molecolare nel trattamento antiretrovirale in Africa

Nell'ambito del programma DREAM una rilevanza particolare assume la diagnostica, intesa sia come diagnostica di primo livello, sia come diagnostica avanzata quale, ad esempio, la quantificazione della carica virale e la valutazione della popolazione sottolinfocitaria CD4+. L'immunofenotipizzazione leucocitaria nel monitoraggio dell'infezione da HIV in Occidente è infatti routine ormai da anni, ma in Africa questa possibilità, nell'ambito dei servizi resi dai sistemi sanitari nazionali, è molto limitata – se non assente – nella stragrande maggioranza dei paesi. Tuttavia disporre di un conteggio affidabile del numero di CD4+ presenti nel sangue del paziente rappresenta oggi un fattore indispensabile nella somministrazione della terapia antiretrovirale. Il quadro clinico esatto di un paziente affetto da HIV si compone, oltre che delle osservazioni prettamente cliniche proprie del medico, anche di risultati analitici, che devono essere solidi e affidabili. Così pure metodiche di biologia molecolare, che misurano il DNA o l'RNA virale, consentono di monitorare efficacemente la terapia in soggetti trattati con farmaci che inibiscono la replicazione del virus. Per questo il programma DREAM comprende il laboratorio di biologia molecolare, come specifico supporto al servizio di diagnosi e cura dell' HIV. Le indagini di laboratorio che si reputano necessarie a questo scopo sono pertanto quelle che consentono il monitoraggio della terapia e dei possibili effetti tossici correlati e prevedono la messa a punto e l'utilizzo di varie tecniche analitiche con differenti livelli di complessità e specializzazione. Il primo livello prevede la determinazione accurata dell'emocromo e della formula leucocitaria. Questa indagine è cruciale per l'utilità del referto finale, data la caratteristica dell' HIV di attaccare e uccidere specificatamente i linfociti CD4+, nonché per il monitoraggio degli effetti tossici di farmaci di primo impiego quali la zidovudina. Il secondo livello corrisponde alla necessità di monitorare lo stato della funzionalità renale ed epatica e di misurare la concentrazione di ioni specifici quali il Fe^{2+} . Il terzo livello prevede il conteggio strumentale in doppia piattaforma delle sottopopolazioni linfocitarie, specificatamente CD4+ e CD8+, supporto fondamentale per monitorare la terapia antiretrovirale e lo stato di salute del paziente [129].

Il quarto livello di specializzazione consiste nella applicazione delle metodiche analitiche necessarie per la quantificazione della carica virale plasmatica. Questo parametro è un

indice dello stato di infezione ed insieme al conteggio dei CD4+ costituisce uno dei parametri centrali nella valutazione della terapia da somministrare. La classificazione operata non può ignorare altre pratiche di laboratorio che, sebbene non catalogabili in termini di specializzazione e complessità, contribuiscono a pieno titolo alla validità del servizio reso dal laboratorio stesso. Tra queste si individuano:

- 1) la possibilità di eseguire test rapidi di sieropositività su sangue intero, plasma o siero;
- 2) la possibilità di produrre acqua distillata di grado analitico per le diluizioni e le preparazioni previste dai vari kit diagnostici utilizzati;
- 3) l'utilizzo di un efficace sistema di sterilizzazione e smaltimento dei rifiuti;
- 4) la conservazione alla corretta temperatura di reattivi e campioni di sangue intero, siero e plasma, anche per la costituzione di una sieroteca;
- 5) lo sviluppo e l'implementazione di un software proprietario per la gestione degli esami.

Una riflessione a parte va fatta a proposito della manutenzione della strumentazione. In un paese a risorse limitate, spesso l'introduzione di un laboratorio di biologia molecolare solleva per la prima volta il problema della manutenzione di sofisticate apparecchiature di laboratorio. Spesso le Ditte produttrici di macchinari diagnostici sono presenti nei paesi in via di sviluppo solo con reti di vendita, e a volte neppure in modo diretto, tanto che, come si sa, spesso i costi complessivi relativi alla diagnostica rappresentano ancora un ostacolo serio all'implementazione su larga scala del monitoraggio biologico della terapia.

Pertanto occorre prevedere momenti di formazione specifica per il personale locale addetto all'uso e alla manutenzione, che possa assicurare nel tempo l'assistenza tecnica indispensabile. Nel contempo è necessario che i laboratoristi acquisiscano un minimo di capacità tecnica, per effettuare almeno la manutenzione di base degli strumenti, al fine di consentire una certa autosufficienza del laboratorio, laddove l'intervento del tecnico manutentore può non essere garantito in tempi brevi e in ogni circostanza [128].

La struttura

L'utilizzo di metodiche avanzate pone dei problemi sull'adeguatezza della struttura destinata ad accogliere il laboratorio. A questo proposito si elencano i requisiti minimi che si ritiene debbano avere i locali, tenendo presente che questo tipo di strutture possono essere realizzate presso centri medio-grandi.

Stato dei locali: gli spazi devono garantire la possibilità di dislocare opportunamente i diversi momenti analitici. In particolare deve essere predisposta una sala destinata all'accettazione e refertazione, anche ad uso ufficio-archivio. Deve essere altresì presente uno spazio confinato dove trattare i rifiuti infetti mediante l'utilizzo dell'autoclave. È necessario un locale magazzino o che almeno il materiale di scorta, in cartoni e scatole, sia confinato in un'area dove non vengono processati i campioni. Gli spazi destinati alla virologia dovranno essere sufficientemente ampi da consentire il flusso unidirezionale del campione, per evitare contaminazioni. Le superfici illuminanti non devono comunque consentire l'apertura all'esterno. Eventuali finestre vanno sigillate ed eventualmente dotate di tende in materiale lavabile e non assorbente. È importante che il pavimento sia in materiale lavabile (es linoleum trattato con prodotti ceranti) e non poroso. Le pareti e gli infissi devono essere integri e possibilmente trattati con vernici lavabili. I piani dei banchi di lavoro devono essere lavabili e resistenti agli acidi. Tutti i locali devono essere condizionati e, nel dimensionamento dell'impianto di condizionamento d'aria del locale dove verranno dislocati il citofluorimetro e il freezer a -80° C, si deve tenere conto del calore prodotto dalle macchine. È bene assicurarsi che l'impianto elettrico sia provvisto di messa a terra; in caso contrario, occorre predisporre il cavo con lo scarico a terra, data la presenza in laboratorio di apparecchiature elettriche che prevedono l'utilizzo di acqua. La fornitura costante e continua di energia elettrica è indispensabile. Date le condizioni ambientali e la possibilità non remota di sbalzi di tensione o di assenze temporanee o prolungate, è necessario prevedere un generatore autonomo di corrente che sia in grado di intervenire in modo automatico, anche di notte, in considerazione del fatto che alcune delle metodiche adottate richiedono un'incubazione *overnight* e che i *freezer* per la conservazione a -80° C non sono in grado di conservare temperature tanto basse a lungo, con il rischio di scongelare e rendere inservibili campioni e costosi reattivi. Lo stesso *freezer* deve essere collegato al quadro elettrico generale in modo diretto per evitare che l'assorbimento del motore possa interferire con la restante strumentazione. Sono utili stabilizzatori di corrente a corredo delle apparecchiature più sofisticate, quali il citometro, che utilizza una sorgente di luce laser.

Parametri analitici

È bene ricordare che in DREAM il laboratorio è destinato all'esclusivo monitoraggio della terapia antiretrovirale. Pertanto, benché sia possibile occasionalmente eseguire test di screening, non è questa la sua funzione peculiare. I test rapidi per l'HIV, svincolano del tutto l'operatore dal laboratorio, in quanto questi test possono essere eseguiti ovunque tenendo presenti i requisiti minimi necessari per un'efficace salvaguardia dell'operatore. Si può attrezzare un kit comprendente lancette monouso cotone idrofilo, disinfettante e guanti monouso per eseguire il test in qualunque sede. Per questo motivo i test di screening adottati nel programma sono stati scelti in modo da consentirne l'esecuzione principalmente nei centri di diagnosi e cura, dando la possibilità di organizzare il lavoro in modo tale da poter effettuare nello stesso giorno il test di positività e il counselling, inviando al laboratorio specializzato solamente i campioni dei pazienti positivi. Si utilizzano test che prevedono l'utilizzo sia del siero che del plasma che del sangue intero.

I parametri indispensabili da determinare sono:

- 1) Emocromo e formula leucocitaria completa
- 2) Funzionalità epatica
- 3) Funzionalità renale
- 4) Sideremia
- 5) Valore percentuale e assoluto di CD4+ e CD8+
- 6) Carica virale come livello di RNA plasmatico.

Determinazioni analitiche

EMATOLOGIA: Il conteggio degli eritrociti e dei leucociti va eseguito con apparecchi automatici che consentono la conta separata dei due tipi cellulari. I leucociti vanno contati dopo lisi degli eritrociti. Inoltre è necessario che l'apparecchio possa contare in modo differenziato, sia in percentuale che in valore assoluto, le sottopopolazioni leucocitarie e le piastrine. È bene avere la possibilità di rapporti stampa per ogni determinazione.

L'apparecchio necessario per il conteggio delle sottopopolazioni linfocitarie è il citometro a flusso, o citofluorimetro. Dal punto di vista della determinazione ai fini diagnostici dei linfociti CD4+ e CD8+, il tipo di citofluorimetro più largamente utilizzato in occidente è quello al laser blu, eventualmente associato con un laser rosso opzionale. Questo è l'unico

tipo di macchina che consente una determinazione routinaria accurata e realistica delle sottopopolazioni linfocitarie anche se non è sicuramente il più conveniente. Esistono altre macchine che tendono ad ovviare ai notevoli costi di acquisto di un citofluorimetro con laser blu a scapito del numero di parametri determinabili. È possibile ad esempio, utilizzando laser verdi o rossi, ridurre di molto i costi, perdendo però la possibilità di utilizzare una serie di fluorocromi che invece risultano importanti per i controlli interni e per la valutazione complessiva della acquisizione. Un'altra tendenza di mercato è di ridurre la fluidica e l'ottica fino a rendere questi citofluorimetri delle macchine praticamente trasportabili. Queste tuttavia presentano una maggiore facilità di intasamento dei condotti dei fluidi e una instabilità di flusso rispetto ad una macchina fissa; inoltre si riscontrano problemi di instabilità della sorgente luminosa a causa della difficoltà di controllo della temperatura interna del citofluorimetro stesso. Per questo motivo, per attrezzare un laboratorio di riferimento DREAM, si è scelto un citometro che costituisce uno degli standard occidentali, equipaggiato con laser ad argon. Il sistema è inoltre fornito di un meccanismo "carousel" che consente di automatizzare le operazioni di inserimento delle provette contenenti il sangue da testare, diminuendo la manipolazione del campione. Infine il citofluorimetro comunica con un computer che ne imposta l'attività e memorizza i risultati ottenuti costituendo al tempo stesso un'importante base dati.

Il conteggio dei CD4+ e CD8+ in valore assoluto viene calcolato in doppia piattaforma. I campioni vengono processati secondo la metodologia "*lyse non wash*", con utilizzo di lisante generica, e con impiego di volumi di anticorpo ridotti [130-133].

BIOCHIMICA: queste determinazioni sono eseguite con metodi colorimetrici e necessitano di uno spettrofotometro. È sufficiente una strumentazione con filtri intercambiabili che permettano la selezione di tre o quattro lunghezze d'onda, quelle necessarie per la determinazione colorimetrica dei parametri più frequentemente richiesti. Di solito si misurano: transaminasi, albumina, amilasi, bilirubina diretta e totale, creatinina, sideremia. È importante che il fotometro abbia un sistema di autocampionamento, multiplo o singolo, in modo da eliminare il rischio per l'operatore legato alla movimentazione delle cuvette nell'alloggiamento del sistema; è ugualmente necessario che il fotometro abbia un sistema di scrittura e/o memorizzazione dei dati, meglio quindi evitare macchine con solo display. Sono stati messi a punto micrometodi che consentono l'utilizzo di volumi ridotti di reagenti e di siero. I micrometodi sono stati validati internamente e vengono periodicamente

verificati. L'accettabilità del metodo è subordinata ad un valore $r > 0.9$ delle rette di regressione. È conveniente utilizzare metodi che impiegano minori volumi (micrometodi). Valutando il volume utile della cella è possibile sviluppare micrometodi che, utilizzando volumi studiati su misura per la macchina, riducono sensibilmente la spesa fissa dei reagenti necessari per ogni determinazione. L'altro vantaggio che si riscontra è la possibilità di ridurre i volumi di campione, soprattutto in pediatria e neonatologia, dove è difficile prelevare grandi quantità di sangue venoso. Ciò è reso possibile da una serie completa di micropipette automatiche ma soprattutto da un know-how tecnico degli operatori perfettamente in grado di lavorare routinariamente con microvolumi. Altri vantaggi sono la riduzione del materiale liquido infetto da smaltire e una minore manipolazione del campione da parte dell'operatore [134, 135].

CARICA VIRALE: la misura dell'RNA virale plasmatico è eseguita mediante bDNA (branched DNA). Questo metodo offre il vantaggio di essere basato sull'amplificazione del segnale e non del bersaglio, come invece sono le metodiche che utilizzano la PCR (polimerase chain reaction). Per questo motivo la bDNA risulta essere meno sensibile alla contaminazione, e non risente degli errori tipici dei procedimenti di PCR (amplificazione di RNA contaminanti, mutazioni indotte dalla polimerasi). Questo porta a poter ridurre il livello di sterilità necessario per l'esecuzione dell'analisi.

Il kit VERSANT[®] HIV-1 RNA 3.0 assay (bDNA) è un metodo ad ibridazione a sandwich degli acidi nucleici, per il dosaggio quantitativo dell'RNA del virus HIV-1 nel plasma umano. È necessario procedere alla concentrazione preliminare dell'HIV-1 dal plasma mediante una centrifugazione. L'RNA genomico dell'HIV-1, rilasciato dai virioni, viene catturato sulla superficie di un micropozzetto mediante una serie di sonde bersaglio specifiche, oligonucleotidiche e sintetiche. Una serie di sonde bersaglio viene ibridizzata con l'RNA virale e con le sonde preamplificatrici. Le sonde di cattura, che comprendono 17 estensori individuali di cattura e le sonde bersaglio, che includono 81 estensori individuali del bersaglio, si legano a varie regioni del gene *pol* dell'RNA virale. Le sonde amplificatrici ibridano con il preamplificatore formando un complesso di DNA ramificato (branchedDNA o bDNA).

Copie multiple di una sonda marcata con fosfatasi alcalina vengono quindi ibridate al complesso immobilizzato. La rivelazione si ottiene incubando il complesso con un substrato chemiluminescente. L'emissione di luce è direttamente proporzionale alla quantità di HIV-1 RNA presente in ogni campione; i risultati vengono letti come unità di luce relativa (RLU)

da un luminometro per micropiastre viene quindi generata una curva standard attraverso l'emissione di luce prodotta da standard contenenti concentrazioni note di virus HIV-1_{8E5/LAV}. Le concentrazioni di HIV-1 RNA nei campioni sono determinate mediante interpolazione da questa curva standard [136-138].

Il metodo è di relativamente facile esecuzione, anche se comporta l'impiego di microvolumi e necessita di due giornate di lavoro, con tempi rigidi di esecuzione dei vari passaggi.

Gli svantaggi del metodo sono certamente il costo molto elevato del kit, unito al fatto che non si può processare un campione singolo: per ottimizzare l'uso del kit è necessario processare molti campioni contemporaneamente e allungare i tempi di risposta. Inoltre la tecnica della bDNA è influenzata dalla instabilità dei reagenti, in particolare degli RNA di controllo, che servono a determinare la curva standard da cui ricavare la carica virale dei campioni in esame. Questi reattivi vanno rigorosamente conservati in freezer a -80°C. Anche i substrati luminescenti utilizzati dal sistema di rilevazione sono estremamente fotosensibili e vanno conservati con accortezza.

Per quanto riguarda la diagnosi precoce di infezione in bambini al di sotto dei 18 mesi, il dosaggio degli anticorpi non è utilizzabile, in quanto in questa fascia di età è possibile che siano ancora presenti nel bambino gli anticorpi materni. Si rende necessaria perciò la ricerca diretta del virus, mediante la biologia molecolare. In questo caso è sufficiente un'analisi qualitativa, del tipo SI/NO. Per ottenere questo risultato è comunque possibile utilizzare il sistema bDNA, stabilendo un cut off di positività (viene proposto il valore di 5.000 copie/ml). Tuttavia la metodica richiede almeno 1 ml di plasma, che, nel caso di prelievi effettuati in soggetti molto piccoli (i protocolli DREAM prevedono la prima carica virale a 1 mese di vita) possono risultare molto difficili e pesanti per il piccolo paziente. Pertanto, là dove è possibile rispettare gli standard di qualità richiesti, è previsto l'uso della PCR qualitativa. Il vantaggio consiste soprattutto nel campionamento. Infatti, poiché la PCR amplifica il bersaglio, buoni risultati si possono ottenere anche partendo da quantità di campione molto basse. E' possibile addirittura usare per il campionamento il sistema con Dry Blood Spot (DBS) che consente di raccogliere poche gocce di sangue venoso e di trasportare facilmente al laboratorio il campione su questo tipo di carta da filtro a temperatura ambiente.

Al momento l'utilizzo di DBS in PCR per la ricerca di HIV è validato solamente per la diagnosi qualitativa. La possibilità di estendere questa metodica alla diagnosi quantitativa

amplierebbe enormemente la possibilità di utilizzo della carica virale, data anche la facilità di conservazione e trasporto del campione, in aree in cui le infrastrutture sono fragili e la logistica è spesso un ostacolo pesante [139-141].

I flussi

Di norma il sangue viene portato in laboratorio chiuso dentro contenitori coibentati leggermente refrigerati, entro la mattinata.

Accettazione dei campioni: I campioni arrivano dai vari centri di diagnosi e cura accompagnati sempre da una scheda, sulla quale deve essere indicato almeno il numero di cartella clinica, il nome del paziente, la provenienza e la firma del responsabile del centro, nonché il numero di provette prelevate per ciascun paziente. La funzione accettazione controlla che ad ogni scheda corrisponda il numero di provette indicate e che siano tutte correttamente siglate.

Procedendo all'accettazione del campione utilizzando il programma di gestione del laboratorio, verrà assegnato in automatico a ciascun campione un numero progressivo che va riportato su ciascuna aliquota e sulla scheda di accompagnamento e che identificherà in modo univoco il campione in tutti i suoi percorsi all'interno del laboratorio. In questo modo, a tutela della privacy, all'interno del laboratorio si lavora in base ad un identificativo e non ai dati anagrafici del paziente. Normalmente le aliquote consegnate sono rappresentate da 2 provette tipo vacutainer con tappo viola, contenente K(3)EDTA, per ematologia e determinazione dell'RNA plasmatico, e una con tappo rosso, senza anticoagulante, per la biochimica.

Centri distanti

Quando i campioni provengono da centri molto distanti dal laboratorio di riferimento (diverse ore di macchina) è necessario adottare alcune precauzioni, ai fini di conservare una buona qualità della risposta analitica.

Nel caso di richiesta di determinazione dei CD4+ occorre richiedere ai centri distanti di attrezzarsi almeno per la lettura dell'emocromo. Le informazioni riassunte in un esame di questo tipo infatti sono di primaria importanza, non solo nella cura del malato di AIDS, ed è quindi necessario per questa determinazione affidarsi al conteggio automatico che consente di valutare una popolazione cellulare di ampiezza estremamente superiore a

quella che è possibile determinare al microscopio. D'altro canto esistono in commercio apparecchi di semplice utilizzo e manutenzione, adatti anche a piccole routine. Il risultato analitico va quindi inviato al laboratorio di riferimento che lo può utilizzare per la determinazione dei CD4 se lavora col metodo della doppia piattaforma. Le provette contenenti sangue intero con anticoagulante (K3EDTA) vanno tenute lontano dall'azione diretta del sole e possono essere processate al citofluorimetro fino a 72 ore dopo il prelievo. Il sangue intero non va refrigerato. Sono allo studio stabilizzatori cellulari che teoricamente sono in grado di immortalizzare o quasi le cellule ematiche. Questa procedura cambia lo scattering delle cellule e quindi va utilizzata dopo un accurato settaggio della macchina.

Nel caso di richiesta di determinazione della carica virale, occorre tenere presente che il campione andrebbe teoricamente trattato entro le 4 ore dalla raccolta. Tempi di consegna molto lunghi comportano importanti sottostime dell'RNA plasmatico. Questo rappresenta una forte limitazione all'utilizzo della carica virale nel monitoraggio del paziente con AIDS in Africa. Si possono accettare campioni raccolti in giornata, o, al limite, plasma di campioni raccolti il giorno precedente ma che sia stato separato entro poche ore e conservato e trasportato fino al laboratorio a temperatura di 4 °C.

Le provette dovranno essere alloggiare dentro contenitori coibentati, in appositi portaprovette, racchiusi in appositi sacchetti, usando per l'imballaggio materiale in grado di assorbire gli urti (polistirolo, gommapiuma).

Refertazione

I risultati delle diverse determinazioni vanno registrati su supporto informatico al più tardi il giorno seguente l'analisi. Il referto viene stampato e consegnato solo quando è completo di tutte le analisi richieste: solo la carica virale può essere refertata in un secondo momento, mediante stampa su etichette che riportino almeno i riferimenti del paziente e il dato analitico. I referti vengono piegati, imbustati e messi in apposite cartelle, una per ogni centro di provenienza.

Smaltimento dei rifiuti

Lo smaltimento dei rifiuti riveste una valenza di sanità pubblica. È possibile bruciare il materiale contaminato, ma occorre che ciò venga fatto controllando che tutto il materiale

sia effettivamente andato distrutto. In mancanza di un efficace sistema di sterilizzazione e smaltimento dei rifiuti si può prevedere l'utilizzo di un'autoclave tarata con tempi e temperature come da protocolli internazionali, cioè almeno 15 minuti a 120° C in condizioni di saturazione di vapore. L'avvenuto trattamento viene monitorato tramite adesivo contenente una sostanza virante al calore. I rifiuti così inertizzati vengono smaltiti normalmente assieme ai rifiuti non infetti. I rifiuti liquidi (surnatante, siero in eccesso ecc.) vengono raccolti in contenitori di plastica rigida contenenti 100/200 ml di soluzione di ipoclorito di sodio al 5%, lasciati a contatto *overnight* e successivamente smaltiti normalmente.

Sicurezza

In ogni laboratorio sono necessarie precauzioni e misure di sicurezza per la protezione degli operatori. È opportuno che vengano sottolineate le norme principali che riguardano il laboratorio in genere, la manipolazione del campione e l'utilizzo delle apparecchiature più comuni [142].

Il controllo di qualità del circuito diagnostico

Un effettivo controllo di qualità di un procedimento complesso come la determinazione di parametri diagnostici, prevede l'impostazione di regole per ogni singolo passaggio svolto. Bisogna cioè analizzare e validare l'intero processo del circuito diagnostico e non solamente un aspetto dello stesso.

A tal fine sono stati valutati i passaggi-chiave dell'intero percorso di un campione di sangue, dal prelievo alla refertazione, passando per il trasporto e l'effettivo impiego nelle metodiche strumentali, così da evidenziare i momenti operativi che necessitano di validazione. Qualunque genere di controllo di qualità non può prescindere da un campione rappresentativo come numero e qualità della popolazione da investigare, tale da fornire un risultato statisticamente significativo. Per tutti i parametri analitici eseguiti vengono allestiti i grafici di Levey-Jennings per monitorare la qualità dei risultati, utilizzando i controlli positivi alto e basso di ogni seduta analitica, mentre la valutazione delle situazioni di fuori controllo viene studiata mediante applicazione delle regole di Westgard [143].

1.15 I personale contributo operativo all'interno del progetto DREAM

La mia personale collaborazione con la comunità di Sant'Egidio all'interno del progetto DREAM è nata nel 2005 in Mozambico, permettendo lo svolgimento di uno studio che è stato oggetto della tesi di laurea magistrale in Biologia Applicata alla Ricerca Biomedica nel 2007.

La collaborazione è continuata fino ad oggi con un nuovo progetto in Malawi, svolto nel corso del triennio di dottorato di ricerca in Sanità Pubblica.

Diverse missioni in Malawi mi hanno ripetutamente coinvolto, per molti mesi nel triennio, ed hanno previsto, oltre allo sviluppo del presente studio, l'affiancamento e il supporto al personale locale di DREAM riguardo le attività di diagnosi e di monitoraggio normalmente svolte all'interno dei laboratori di biologia molecolare di DREAM.

2. Obiettivi

OBIETTIVI GENERALI

Lo scopo del presente lavoro di tesi di dottorato è stato quello di caratterizzare l'infezione da virus dell'epatite B (HBV) in Malawi in una coorte di donne HIV positive.

OBIETTIVI SPECIFICI

In particolare il presente studio si è posto i seguenti obiettivi specifici:

- studiare la prevalenza di infezione da HBV in donne HIV sieropositive. Al momento infatti non vi sono dati esaustivi in letteratura sulla diffusione di tale infezione in Malawi e, in particolare, non è nota la frequenza di co-infezioni HIV/HBV;
- valutare la frequenza di infezioni "occulte" da HBV nella coorte di studio. Dati bibliografici presentano infatti prevalenze contrastanti riguardo i casi di infezione da HBV "occulta" in soggetti immunocompromessi, non definendo le reali dimensioni e le caratteristiche specifiche del problema. Per il Malawi, in particolare, non sono disponibili dati relativi all'infezione occulta da HBV, il cui impatto potrebbe essere rilevante specialmente per le pazienti in trattamento HAART;
- fornire la base per l'implementazione di strategie diagnostiche e preventive nei confronti dell'epatite B in Malawi.

3. Materiali e Metodi

3.1 Popolazione in Studio

Questo studio retrospettivo è stato condotto a partire da campioni di plasma conservati ad una temperatura di -80°C , raccolti da donne HIV positive afferenti alle strutture dei centri DREAM di Blantyre, Balaka e Lilongwe (Malawi), previa accettazione e firma del consenso informato.

La decisione del coinvolgimento della popolazione femminile è derivata da osservazioni relative al contesto locale: la maggioranza dei soggetti HIV positivi afferenti presso i centri DREAM in Malawi sono, infatti, donne ed in generale nel Paese si registra una maggior percentuale di soggetti HIV positivi tra la popolazione femminile [84].

L'indagine sulla diffusione dell'infezione da HBV tra le donne malawiane è stata inoltre progettata in funzione di individuare e/o migliorare strategie di prevenzione mirate al controllo della trasmissione dell'infezione, in particolare da madre a figlio, attuabili all'interno nel programma DREAM in un prossimo futuro.

AREA GEOGRAFICA IN STUDIO

Campioni di plasma sono stati raccolti dalla popolazione femminile adulta in modo proporzionale nei 3 principali centri DREAM attivi nel paese: Blantyre, Balaka e Lilongwe.

Le aree geografiche di appartenenza dei 3 Centri hanno caratteristiche molto differenti e particolari.

Il centro DREAM di *Blantyre*, nel sud del Paese, è inserito all'interno di una realtà urbana in continua espansione edilizia con il conseguente sviluppo del fenomeno delle *townships*, enormi aree occupate da migliaia di persone provenienti dalle zone rurali e, una volta in città, costrette in uno spazio vitale angusto ed affollato. Il centro DREAM di Blantyre è quindi in continua crescita (costituisce infatti il centro di riferimento in Malawi), con un vertiginoso aumento del numero giornaliero di pazienti afferenti. Il sovraffollamento, oltre ad accrescere notevolmente il carico di lavoro all'interno della struttura sanitaria DREAM, comporta, come conseguenza, elevati tassi di trasmissione delle infezioni più comuni, favoriti da un ambiente poco protetto, promiscuo e con scarse condizioni igieniche.

La cittadina di *Balaka*, a 200 km a nord di Blantyre, si trova in un'area centrale del Malawi completamente rurale e caratterizzata dalla presenza di numerosi piccoli villaggi dispersi nel *bush* africano. Al centro DREAM di Balaka afferiscono quindi pazienti provenienti da una vastissima zona per i quali si è resa necessaria la costruzione di piccoli centri satelliti dispersi, in modo da evitare loro giorni di cammino per raggiungere il centro e poter fornire un servizio capillare. Data la rilevante estensione dell'area servita, anche Balaka è in continuo sviluppo, costituendo uno dei pochi servizi sanitari pubblici e funzionali presenti. Anche qui i tassi di trasmissione delle più comuni infezioni sono elevati ed imputabili alla scarsa assistenza sanitaria fornita e all'estrema povertà.

Il centro DREAM di *Lilongwe* è inserito all'interno di una realtà semi-urbana. Lilongwe è la capitale del Paese, decretata tale durante il regime dittatoriale, nel periodo immediatamente successivo all'indipendenza dal dominio inglese. Lilongwe non rispecchia la struttura di una tipica capitale bensì è caratterizzata da un insieme di villaggi riuniti attorno a un centro cittadino limitato. Con l'avvento dei tempi moderni si è verificato un certo sviluppo, ma la strana conformazione urbana non ha mai permesso a Lilongwe di raggiungere livelli di espansione e sovraffollamento paragonabili a quelli della città di Blantyre, la vera capitale economica del paese. Il centro DREAM di Lilongwe è un centro di riferimento sia per la popolazione cittadina che per coloro che vivono nelle campagne ma,

essendo una realtà a sviluppo limitato, anche il numero di pazienti sembra aver raggiunto un plateau che, pur con le dovute oscillazioni, sarà difficile superare. Il potenziale numero di soggetti infetti da HIV sembra essere stato raggiunto e la limitazione della diffusione dell'infezione è in parte attribuibile alla presenza di alcuni centri DREAM satelliti nelle aree più remote.

3.2 Metodi

Il lavoro sperimentale è stato organizzato attraverso il disegno di una Flow Chart (Figura 12) per le analisi sierologiche e molecolari al fine di definire il profilo sierologico e determinare la presenza di HBV-DNA per ogni paziente arruolato nello studio.

3.2.1 Indagini sierologiche condotte presso i laboratori DREAM in Malawi

Sono stati allestiti in Malawi, presso il laboratorio di biologia molecolare DREAM di Blantyre, saggi sierologici mediante utilizzo di kit Immunoenzimatici commerciali (Abbott, Murex) per la rilevazione, in ordine di determinazione, dei seguenti marcatori sierologici: anti-HBc (marker di esposizione ad HBV), anti-HBs (indicativo di una risoluzione dell'infezione e di acquisizione di immunità) e HBsAg (marcatore indicativo di infezione acuta o cronica).

Seguendo l'ordine definito nella Flow Chart in Figura 12, i campioni di plasma raccolti sono stati inizialmente analizzati per la presenza di anticorpi anti-HBc, mediante l'utilizzo di un kit commerciale Murex anti-HBc (total), (Abbott-Murex, Dartford, UK).

I campioni risultati anti-HBc positivi sono stati analizzati per la determinazione degli anticorpi anti-HBs, mediante applicazione del kit commerciale Murex anti-HBs (Abbott-Murex, Dartford, UK). Infine, i campioni anti-HBs negativi sono stati analizzati per la

ricerca del marcatore HBsAg, con l'ausilio del kit commerciale Murex HBsAg V 3.0 (Abbott-Murex, Dartford, UK)

Le indagini sierologiche sono state condotte presso il laboratorio DREAM di Blantyre, in Malawi.

3.2.2 Indagini di biologia molecolare condotte presso i laboratori DREAM in Malawi

3.2.2.1 Determinazione quantitativa di HBV-DNA mediante branched-DNA

I campioni di plasma risultati sierologicamente con profilo definito "anti-HBc isolato" (anti-HBc+/anti-HBs-/HBsAg) e i campioni di plasma risultati positivi per HBsAg sono stati sottoposti a un saggio quantitativo per la determinazione della carica virale di HBV-DNA. A tal fine è stato utilizzato il metodo HBV *branched*-DNA v3.0 (Siemens Health Care Diagnostics, Germany), che è caratterizzato da un range dinamico di rilevazione compreso tra le 2000 cp/ml e le 100.000.000 cp/ml di plasma.

Per la definizione dello stato di infezione, i valori di carica virale di HBV-DNA sono stati associati al profilo sierologico specifico di ogni paziente. Le rilevazioni quantitative di HBV-DNA sono state attuate presso il laboratorio di biologia molecolare DREAM di Blantyre, in Malawi.

La metodica *branched*-DNA è una tecnica di dosaggio [144-149] che non amplifica la molecola bersaglio, ma ne rivela direttamente la presenza attraverso una forte amplificazione del segnale. Prevede l'uso di oligodesossiribonucleotidi ramificati (bDNA, per "branched DNA"), che consentono di incorporare fino a circa 3000 molecole di enzima su un'unica molecola bersaglio di acido nucleico, che può essere, indifferentemente, DNA o RNA. Non richiede la purificazione dell'acido nucleico, né le particolari precauzioni previste con le tecniche di amplificazione genomica. Vari oligonucleotidi sintetici specifici per la sequenza bersaglio sono utilizzati per la cattura di quest'ultima sulla superficie di una micropiastra (sonde di cattura). Un secondo gruppo di sonde (sonde di preamplificazione) media l'ibridazione delle sonde di DNA ramificato (sonde di amplificazione) all'acido nucleico bersaglio. Ogni sonda di DNA ramificato (bDNA) ha una quindicina di ramificazioni, ognuna delle quali può legare varie sonde marcate con enzima

(fosfatasi alcalina), dette sonde di marcatura. Da ultimo viene aggiunto un substrato chemiluminescente (diossietano) e viene misurata l'emissione luminosa, la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità di acido nucleico bersaglio presente nel campione. La quantificazione è possibile utilizzando una curva di calibrazione, o di riferimento, ottenuta misurando la fluorescenza sviluppata con quantità note di DNA o RNA.

3.2.3 Indagini di biologia molecolare condotte presso i laboratori della Sezione di Virologia del Dipartimento di Sanità Pubblica, Microbiologia e Virologia dell'Università di Milano

Alcuni campioni analizzati mediante metodica HBV *branched*-DNA sono risultati al di sotto del limite inferiore di rilevabilità (<2000 cp/ml) della v 3.0 ma con valori di luminescenza (RLU, Relative Light Units) tali da essere considerati come positivi. Per questo motivo, sono stati sottoposti ad un'ulteriore indagine molecolare condotta mediante l'applicazione di un saggio semi-quantitativo di PCR *in house*, caratterizzato da una sensibilità più alta.

Oltre a questi campioni, sono stati analizzati anche i campioni risultati anti-HBs positivi, così da verificare la reale di quota di casi di infezioni occulte.

Prima dell'applicazione del saggio è stata valutata la sensibilità della metodica di nested-PCR *in house* mediante diluizioni seriali in base 10 di un campione a concentrazione nota. Le diluizioni testate (350000, 35000, 3500, 350, 35 e infine 3,5 cp/ml) hanno permesso di costruire una curva di sensibilità e di identificare il limite di rilevabilità della metodica risultato essere di 350 copie/ml.

3.2.3.1 Estrazione di HBV-DNA

L'estrazione del DNA a partire da campioni di plasma è stata effettuata mediante l'utilizzo di un Kit commerciale (*QIAamp DNA Mini Kit*, QIAGEN, Germany). Questo metodo permette la purificazione del DNA contemporaneamente la rimozione di proteine, nucleasi o altri contaminanti e inibitori che potrebbero in seguito interferire con l'amplificazione tramite PCR.

La procedura di estrazione viene condotta usando apposite colonnine contenenti una membrana a fibre di vetro ad elevata affinità per gli acidi nucleici; durante le diverse fasi

di centrifugazione, effettuate in una microcentrifuga standard, il filtrato viene raccolto in appositi tubi collettori.

Le fasi della procedura di estrazione sono in breve le seguenti:

aggiungere 200 µl di plasma a 20 µl di Proteinasi K, aggiungervi quindi 200 µl di *buffer* di lisi (BUFFER AL) e, dopo aver vorticato la miscela per almeno 15 secondi, incubare i campioni a 56°C per 15 minuti. La proteinasi K digerirà le proteine sieriche, mentre il BUFFER AL provocherà la lisi cellulare e le condizioni stesse del *buffer* consentiranno il legame ottimale del DNA alla membrana.

La presenza di sali e le condizioni del pH nel lisato assicurano che le proteine e altri contaminanti, che potrebbero inibire la PCR o altre reazioni enzimatiche, non vengano trattenute dalla membrana.

Dopo aver aggiunto 230 µl di Etanolo 96-100% ad ogni campione ed aver vorticato per almeno 15 secondi, trasferire i campioni nelle apposite colonnine. Centrifugare a 8000 rpm per un minuto e trasferire la colonnina in un tubo di raccolta nuovo, eliminando quello vecchio contenente il filtrato. A questo punto il DNA, rimasto legato alla membrana, viene sottoposto a due centrifugazioni con due differenti *buffer* di lavaggio (AW1 e AW2), incrementando significativamente la purezza del DNA eluito e assicurando la completa rimozione degli eventuali contaminanti residui senza influenzare il legame del DNA.

Infine, dopo un'incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti, il DNA è stato eluito in 100 µl di BUFFER AE (10mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA; pH 9) mediante una centrifugazione finale a 8000 rpm per 1 minuto.

L'estratto può essere conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo. Al fine di escludere la possibilità di contaminazioni tra i diversi campioni, ogni estrazione di DNA ha previsto l'utilizzo di controlli negativi di estrazione. Inoltre, per escludere l'eventuale presenza di inibitori o errori durante il procedimento di estrazione, è stato sempre utilizzato un controllo HBV-DNA-positivo.

3.2.3.2 Amplificazione di HBV-DNA mediante nested PCR

La rilevazione di HBV-DNA è stata effettuata mediante l'amplificazione di un frammento di 248 bp appartenente a una regione altamente conservata del gene S.

Questa tecnica si avvale di due successivi *step* di amplificazione:

Primo Step

Nel primo *step* è stato amplificato un frammento di 432 pb del gene *S* utilizzando i seguenti *primer* esterni [150]:

senso (ERS-OU3; nt 252-271): 5'-ACT CGT GGT GGA CTT CTC TC-3'

antisenso (ERS-OU4; nt 687-667): 5'-TGG CAC TAG TAA ACT GAG CCA-3'

La miscela del primo *step* è stata preparata con: 5 µl Buffer 10X (10mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl e 0.1% Triton X-100), 1 µl di dNTP 10mM (FINNZYMES, Finland), 1 µl di ciascuno dei due primers (preparati ad una concentrazione di 20 pmoli\ µl) , 1 µl di Taq (2U/µl) (DyNAzyme TMII DNA Polymerase, FINNZYMES), 31 µl di acqua per un volume finale di 40 µl. Nella miscela sono stati poi inoculati 10 µl dell'estratto di DNA. La reazione è stata fatta avvenire in un termociclatore (*Geneamp PCR System 9700, Applied Biosystems*) alle seguenti condizioni:

N° cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	95°Cx5min		
30	95°Cx1min	56°Cx1min	72°Cx1min
1			72°Cx10min

Secondo Step

Nel secondo *step* è stato amplificato un frammento di 248 pb del gene *S* utilizzando i seguenti *primer* interni [150]:

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

antisenso (ERS-IN3; nt 656-638): 5'-TGA GGC CCA CTC CCA TAG G-3'

un'aliquota di 5 µl di DNA ottenuto dal primo *step* viene introdotto in un volume finale di 45 µl della miscela di reazione composta da: 5 µl di Buffer 10X (10mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl e 0.1% Triton X-100), 1 µl di dNTP 10mM (FINNZYMES, Finland), 1 µl di ciascuno dei due primers (preparati ad una concentrazione di 20 pmoli\ µl), 1 µl di Taq (2U/µl) (DyNAzyme TMII DNA Polymerase, FINNZYMES), 36 µl di acqua di biologia molecolare.

Il secondo *step* è stato condotto in un termociclatore (*Geneamp PCR System 9700, Applied Biosystems*) alle seguenti condizioni di amplificazione:

N° cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	95°Cx5min		
35	95°Cx1min	56°Cx1min	72°Cx1min
1			72°Cx10min

Questa metodica di PCR semi-quantitativa è in grado di rilevare fino a 350 copie virali/ml.(Figura 13)

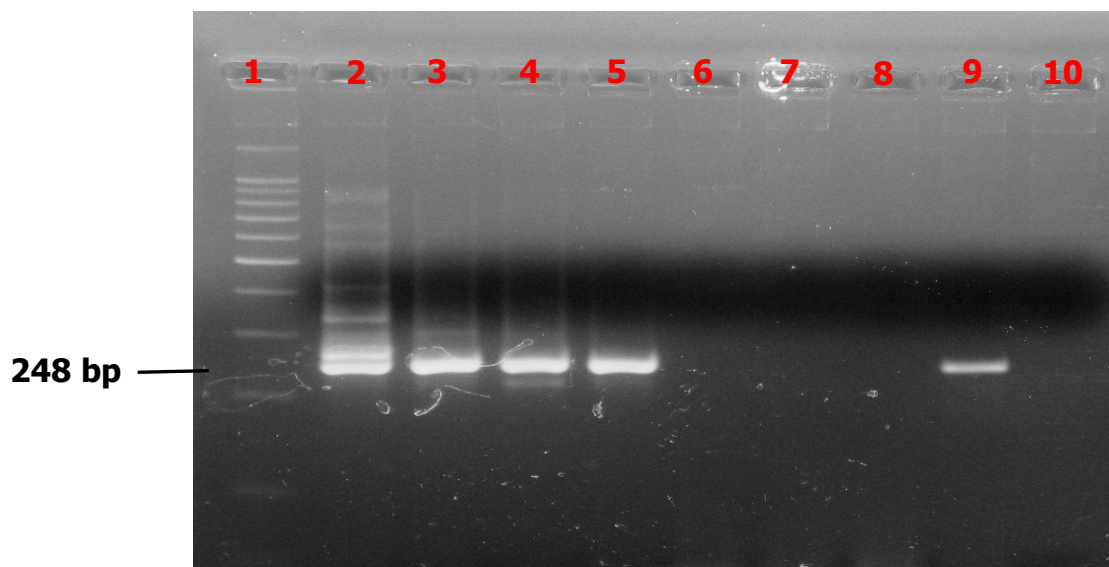


Figura 13: Corsa elettroforetica su gel d'agarosio relativo al saggio di amplificazione del DNA di HBV. Pozzetto 1: marcatore molecolare di riferimento; pozzetto 2: 350000 cp/ml; pozzetto 3: 35000 cp/ml; pozzetto 4: 3500 cp/ml; pozzetto 5: 350 cp/ml; pozzetto 6: 35 cp/ml; pozzetto 7: 3,5 cp/ml; pozzetto 8: controllo negativo (1° step); pozzetto 9: controllo positivo (1° step); pozzetto 10: controllo negativo (2° step).

3.2.3.3 Rilevazione dei prodotti di PCR

La rilevazione dei prodotti di PCR è stata ottenuta tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%. Durante la preparazione sono stati incorporati 15 µl di etidio bromuro che si intercala tra le basi dell'acido nucleico e permette sotto esposizione a raggi UV la visualizzazione del DNA.

Inoltre è possibile riconoscere la presenza e la lunghezza dell'amplificato tramite un opportuno standard esaminato contemporaneamente (*marker 100, BenchTop 100bp DNA ladder, Promega corporation USA*)

L'analisi qualitativa per la determinazione di HBV-DNA è stata condotta presso i laboratori della Sezione di Virologia del Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia dell'Università degli Studi di Milano.

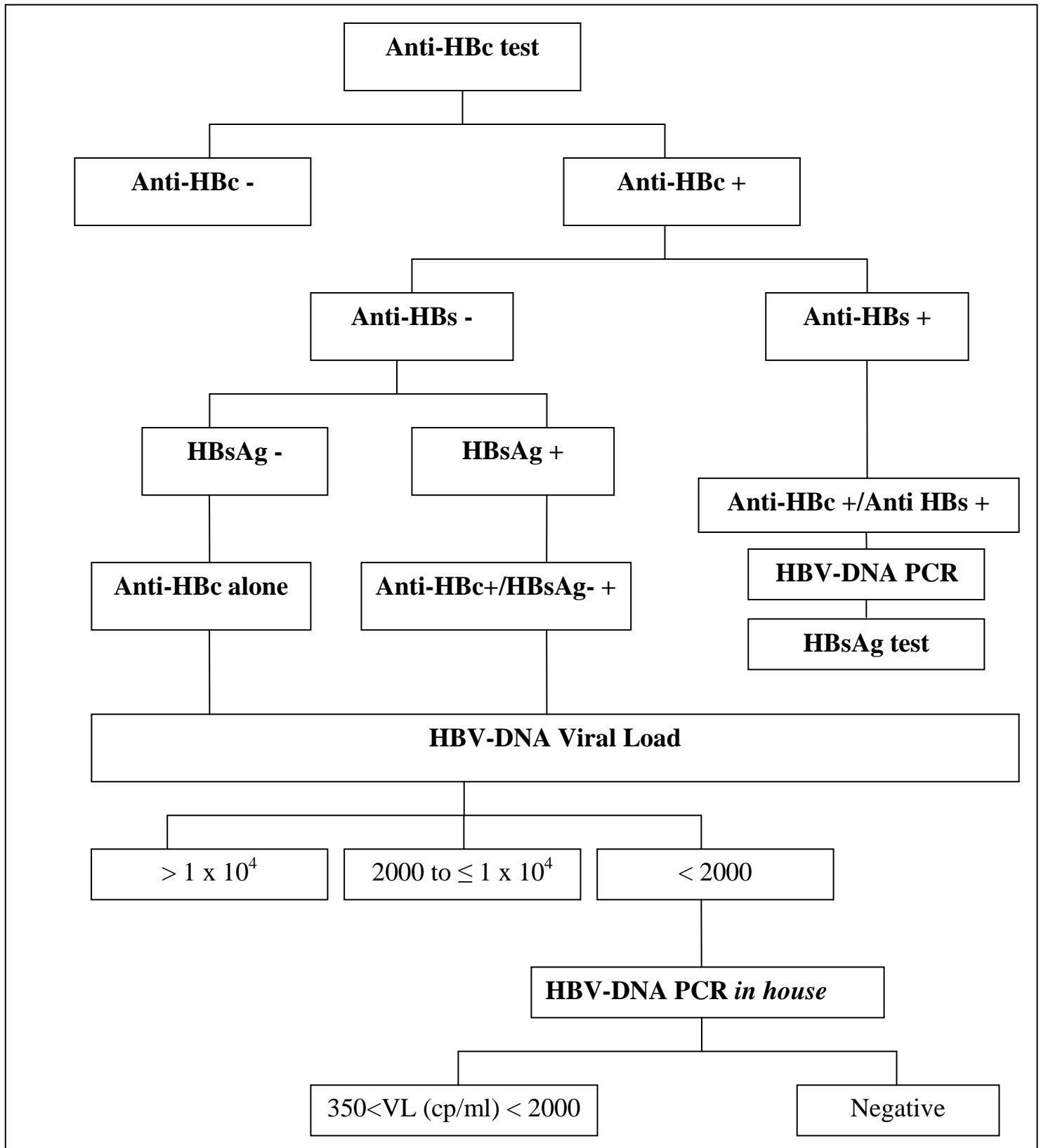


Figura 12: Algoritmo utilizzato per la caratterizzazione dell'infezione da HBV in Malawi

3.2.4 Saggi di nested-PCR per il sequenziamento di una porzione dei geni S e P di HBV

Allo scopo di caratterizzare ulteriormente il virus infettante nei soggetti viremici con profilo sierologico "anti-HBc isolato", il DNA estratto è stato sottoposto a sequenziamento per la determinazione del genotipo di HBV e per l'individuazione di eventuali mutazioni in regione pre-S/S.

La metodica prevede l'amplificazione di tre frammenti parzialmente sovrapposti che coprono quasi completamente la regione genomica (*pre-S1* parziale, *pre-S2* e *S* completi) e di conseguenza anche di una consistente porzione del gene P, essendo le ORF S e P sovrapposte.

Questa tecnica si avvale di due successivi cicli (*step*) di amplificazione:

Primo Step

Questo primo *step* di PCR consente di amplificare due diversi frammenti della regione *pre-S/S* e P, rispettivamente di 911 e 907 bp, attraverso l'utilizzo dei *primers* esterni [151]:

1° frammento (911 bp: nt 2960-655)

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

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

2° frammento (907 bp: nt 202-1108)

senso (HBV-9; nt 202-220): 5'-GGC GG(GT) GG(GT) T TT CTT GTT G -3'

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

Nel primo step di questa PCR, 10 µl di DNA estratto vengono amplificati in 2 diversi miscele di PCR in un volume finale di 50 µl in presenza ciascuna di una coppia di *primers* e entrambe con la seguente composizione: 5 µl Buffer 10X (10mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl e 0.1% Triton X-100), 1 µl di dNTP 10mM (FINNZYMES, Finland), 1 µl di ciascuno dei due primers (preparati ad una concentrazione di 25 pmoli\µl), 0,5 µl di Taq (2U/µl) (DyNAzyme TMII DNA Polymerase, FINNZYMES), 31,5 µl di acqua.

L'amplificazione viene condotta utilizzando un termociclatore (GeneAmp®PCR System 9700 – Applied Biosystems, USA) per entrambi i frammenti alle seguenti condizioni:

N° cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	95°Cx9min		
40	95°Cx50sec	57,5°Cx50sec	72°Cx1,40min
1			72°Cx10min

Secondo Step

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

allo scopo sono state utilizzate coppie di *primers* differenti per i tre frammenti amplificati [151]:

1° frammento (536 bp: nt 2960-280)

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

antisenso (HBV-4; nt 280-257): 5'-TAG GAC CCC T(GT)C TCG TGT TAC AGG-3'

2° frammento (476 bp: nt 180-655)

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

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

3° frammento (700 bp: nt 409-1108)

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

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

un'aliquota di 6 µl di DNA ottenuto dal primo *step* viene inoculata in tre diverse miscele di PCR in un volume finale di 50 µl, in presenza ciascuna di una coppia di *primers* e con la seguente composizione: 5 µl di Buffer 10X (10mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl e 0.1% Triton X-100), 1 µl di dNTP 10mM (FINNZYMES, Finland), 1 µl di ciascuno dei due primers (preparati ad una concentrazione di 25 pmoli\ µl), 0,5 µl di Taq (2U/µl)(DyNAzyme TMII DNA Polymerase, FINNZYMES), 35,5 µl di acqua di biologia molecolare.

L'amplificazione viene condotta utilizzando il medesimo termociclatore e con profili termici differenti per il 1° e 2° frammento e per il 3° frammento

1° e 2° frammento:

N° cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	95°Cx9min		
45	95°Cx45sec	53,5°Cx45sec	72°Cx1,20min
1			72°Cx10min

3° frammento

N° cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	95°Cx9min		
45	95°Cx45sec	59,5°Cx45sec	72°Cx1,40min
1			72°Cx10min

La rilevazione dei prodotti di PCR è stata ottenuta tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%.

3.2.5 Sequenziamento di una regione del gene S di HBV

I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento automatico. Per effettuare l'editing delle sequenze in studio, è stato utilizzato il programma bioinformatico BioEdit (versione 7.0.9.0) [152]. Ciascuna sequenza è stata confrontata con quella di riferimento per identificare le differenze. Ogni differenza è stata poi verificata con l'elettroferogramma della sequenza in esame, per stabilire se si tratta di un errore di lettura oppure di un effettivo cambiamento di base.

Le sequenze nucleotidiche ottenute in formato FASTA sono state allineate con le sequenze presenti nelle banche dati di Blast [153] per l'identificazione del genotipo e delle eventuali

mutazioni geniche. Per lo studio della distribuzione dei diversi genotipi di HBV in Malawi è stata condotta la caratterizzazione molecolare della regione pre-S/S di HBV [154-156]. La caratterizzazione molecolare del genotipo di HBV è stata effettuata tramite analisi filogenetica con il programma di allineamento CLUSTAL X (versione 2.0) [157], allineando tutte le sequenze nucleotidiche del genoma di HBV rilevato nei pazienti in studio con le sequenze di riferimento dei diversi genotipi di HBV, ottenute dalle principali banche dati.

3.2.5 Analisi statistica

Le differenze tra le frequenze ottenute dalle analisi sono state verificate mediante il χ^2 test. Un P-value <0.05 era considerato statisticamente significativo (test a due code). Per questa analisi è stato utilizzato il software OpenEPI version 2.2.1 [158].

4. Risultati

4.1 Presentazione del progetto di studio al comitato etico in Malawi

Per l'attuazione dello studio è risultato necessario presentare una domanda di autorizzazione a procedere presso il comitato etico del Malawi.

Una sintesi del progetto, degli obiettivi e dei risultati attesi è stata sottoposta a esame per l'approvazione ufficiale da parte del *National Health Sciences Research Committee* (NHRSC) con sede a Lilongwe presso il Ministero della Salute del Malawi, secondo la procedura richiesta. Il frutto di questo lavoro è riportato in allegato 1.

Inoltre un opportuno consenso informato è stato scritto in inglese e tradotto in lingua locale (chichewa) (allegato 2).

Il progetto dal titolo "*The evaluation of the HIV/HBV co-infection among HIV positive patients in the DREAM program in Malawi*" è stato approvato dall'NHSRC con numero di approvazione al protocollo: #677.

4.2 Arruolamento della popolazione in studio

Per l'arruolamento delle donne da inserire nello studio sono stati seguiti i seguenti criteri: sesso femminile, età >15 anni, documentata infezione da HIV, disponibilità della cartella clinica e di un'aliquota sufficiente di plasma conservata presso i laboratori di uno dei tre centri DREAM.

L'analisi del database ha permesso di individuare i soggetti che soddisfacevano i requisiti definiti e, quindi, considerati eligibili per lo studio.

In totale 1006 donne HIV positive afferenti presso i centri DREAM in Malawi hanno dato il loro consenso all'utilizzo dei rispettivi campioni di plasma, conservati a -80°, firmando il consenso informato predisposto.

In particolare, 373 donne sono state arruolate presso il centro DREAM di Lilongwe, 381 presso il centro DREAM di Blantyre e 252 presso il centro DREAM di Balaka.

Mediante l'accesso al database elettronico DREAM sono state raccolte informazioni demografiche, cliniche e dati biochimico-virologici, quali età, inclusione o meno nei protocolli di terapia HAART, livelli di transaminasi, carica virale di HIV, numero di CD4 (Tabella 6).

Come riportato, l'età mediana delle 1006 pazienti arruolate era 31 anni (range: 15-70 anni). Il valore mediano di conta dei linfociti CD4 era 301 cell/mm³ (IQR: 159-463 cell/mm³), e il valore medio di viremia di HIV plasmatica era 4.23 Log (range: 3.19-4.88 Log). L'85.2 % delle pazienti era sottoposto a trattamento HAART con una terapia ad attività riconosciuta verso HIV, ma anche nei confronti del virus dell'epatite B (HBV) (tripla terapia con inclusione di lamivudina). Il livello medio di ALT era 16 U/l (range 11.5-23 U/l). I campioni da Balaka e Lilongwe sono stati raccolti e trasferiti, mantenendo la catena del freddo (utilizzo di ghiaccio secco durante il trasporto), al centro DREAM di Blantyre che ha provveduto alla loro conservazione e processamento.

Popolazione in studio	
N= 1006	
<i>Età anni (range)</i>	31 (15-70)
<i>CD4 cell/mm³(IQR)</i>	301 (159 – 463)
<i>HIV VL (log mean copie/ml)</i>	4.23 (3.19 – 4.88)
<i>ALT meedia U/l (range)</i>	16 (11.5 – 23.0)
<i>In terapia HAART</i>	857/1006 (85.2%)

Tabella 6: Caratteristiche della popolazione in studio

4.3 Indagini sierologiche condotte presso i laboratori DREAM in Malawi

Un totale di 1006 campioni di plasma, raccolti da altrettante donne HIV positive afferenti ai centri DREAM di Blantyre, Balaka e Lilongwe in Malawi, è stato testato per la rilevazione di marcatori sierologici di HBV e la determinazione qualitativa e quantitativa di HBV-DNA.

I 1006 campioni di plasma sono stati inizialmente testati mediante kit commerciale (*Murex anti-HBc total*, Abbott-Murex, Dartford, UK) per valutare la presenza degli anticorpi anti-HBc: 566 campioni (566/1006, 56,3%) sono risultati anti-HBc positivi. Questi appartenevano a donne con età mediana di 31 anni (IQR: 26-36 anni). Il livello mediano di ALT è risultato pari a 16,6 U/l (IQR: 11,6-23,2 U/l). La carica virale media di HIV era di 4,21 Log (range 3,09 - 4,85 Log).

La prevalenza di soggetti anti-HBc positivi era significativamente più elevata ($p < 0.05$) nella coorte delle pazienti afferenti al centro di Balaka (168/252, 66.7%) rispetto a quella riscontrata tra lei pazienti di Blantyre (219/381, 57.5%) e a quella ($p < 0.001$) relativa alle donne afferenti al centro di Lilongwe (179/373, 48.1%) (Tabella 7).

	TOTALE N=1006	LILONGWE N=373	BLANTYRE N=381	BALAKA N=252
Anti HBc +	56,3 % 566/1006	48,1 % 179/373	57,5 % 219/381 (**)	66,7% 168/252 (*,***)
Anti HBc + Anti HBs +	56,7 % 315/556	58,8 % 100/170	54,6 % 119/218	57,1% 96/168
Anti HBc+ AntiHBs- HBsAg +	34,4 % 83/241	40,0 % 28/70 (°)	38,4 % 38/99 (°°)	23,6% 17/72
Anti HBc + isolate (Anti HBs -, HBsAg -)	65,6 % 158/241	60,0 % 42/70 (§)	61,6 % 61/99 (§§)	76,4 % 55/72 (§,§§)

Tabella 7: Risultati sierologici suddivisi per i 3 centri DREAM di Lilongwe, Blantyre e Balaka

(*) $p < 0.001$: frequenza di pazienti positivi alla determinazione del marcatore sierologico anti-HBc da Balaka vs Lilongwe

(**) $p < 0.05$: frequenza di pazienti positivi alla determinazione del marcatore sierologico anti-HBc da Blantyre vs Lilongwe

(***) $p < 0.05$: frequenza di pazienti positivi alla determinazione del marcatore sierologico anti-HBc da Balaka vs Blantyre

(°) $p < 0.05$: frequenza di pazienti positivi alla determinazione del marcatore sierologico HBsAg da Lilongwe vs Balaka

(°°) $p < 0.05$: frequenza di pazienti positivi alla determinazione del marcatore sierologico HBsAg da Blantyre vs Balaka

(§) $p < 0.05$: frequenza di pazienti con profilo sierologico “anti-HBc isolato” da Balaka vs Lilongwe

(§§) $p < 0.05$: frequenza di pazienti con profilo sierologico “anti-HBc isolato” da Balaka vs Blantyre

Dei 566 campioni anti-HBc positivi, 556 (98%) sono stati analizzati per la presenza di anticorpi anti-HBs mediante kit commerciale (*Murex anti-HBs*, Abbott-Murex, Dartford, UK), mentre 10 (2%) non erano più disponibili per ulteriori indagini. Dei 556 campioni anti-HBc positivi, 315 (56.7%, 315/556) mostravano positività anche per anticorpi anti-HBs.

I campioni anti-HBs negativi (43.3%, 241/556) sono stati quindi analizzati mediante kit commerciale (*Murex HBsAg V 3.0*, Abbott-Murex, Dartford, UK) per la rilevazione del marcatore HBsAg: 83 (34.4%, 83/241) hanno dato esito positivo.

Questo dato permette di stimare una prevalenza complessiva di portatrici di HBsAg tra le donne HIV positive arruolate nello studio dell'8,3% (83/996).

Nei 3 centri DREAM malawiani, la frequenza di donne HBsAg positive è risultata significativamente più elevata ($p < 0.05$) nelle coorti di Blantyre (38/99, 38.4%) e di Lilongwe (28/70; 40%) rispetto a quella di Balaka (17/72; 23.6%).

Considerando il totale dei soggetti arruolati nei 3 Centri, i dati di prevalenza erano rispettivamente pari al 10% (38/380) a Blantyre, al 7.7% (28/364) a Lilongwe e al 6.7% (17/252) a Balaka.

Un totale di 158 (65,6%, 158/241) pazienti è risultato negativo alla determinazione di HBsAg, presentando quindi il profilo sierologico "anti-HBc+/anti-HBs-/HBsAg-", definito come "anti-core isolato" data la sola presenza del marcatore sierologico anti-HBc. Questo particolare profilo era più frequente ($p < 0.05$) nella coorte di pazienti DREAM di Balaka (55/72; 76.4%) rispetto alle coorti di Blantyre (61/99; 61.6%) e Lilongwe (42/70; 60%).

In Figura 14 è riportato il riepilogo degli esiti dei test sierologici sulla popolazione totale, in base alla Flow Chart definita nel disegno dello studio.

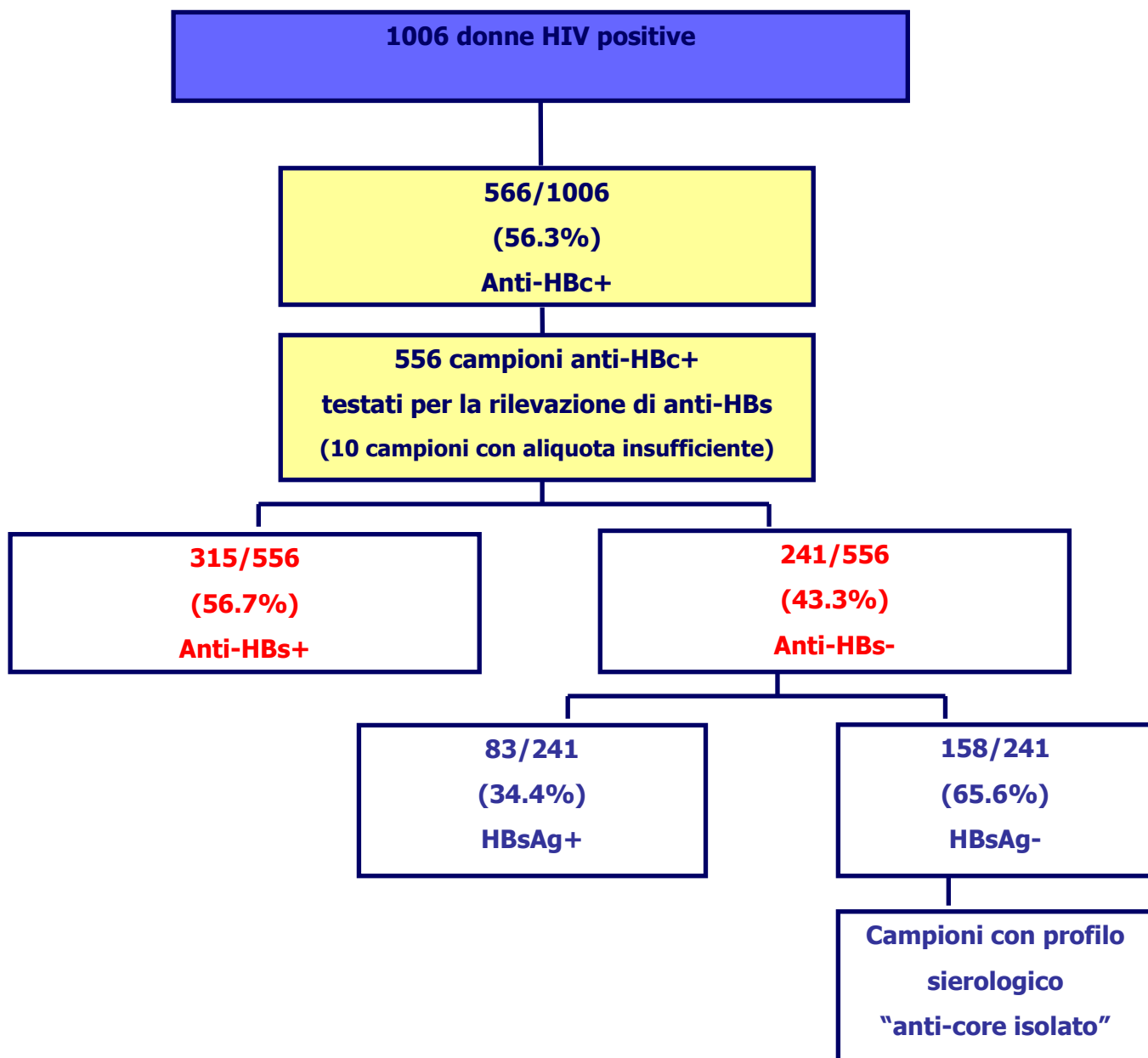


Figura 14: Risultati sierologici riguardanti la popolazione complessiva presa in esame

4.4 Indagini di biologia molecolare condotte presso i laboratori DREAM in Malawi

4.4.1 Determinazione quantitativa di HBV-DNA mediante branched-DNA

I campioni di plasma risultati ai test sierologici con profilo definito come "anti-HBc isolato" (anti-HBc+/anti-HBs-/HBsAg) ed i campioni di plasma risultati positivi per HBsAg sono stati sottoposti ad un saggio quantitativo per la determinazione della carica virale di HBV-DNA basato sul principio *branched-DNA* (*HBV-DNA bDNA kit v3.0, Siemens Health Care Diagnostics, Germany*). Il range dinamico di quantificazione dichiarato dalla metodica è compreso tra 2000 e 100.000.000 copie di DNA per ml di plasma (cp/ml). Le rilevazioni quantitative di HBV-DNA sono state effettuate presso il laboratorio di biologia molecolare DREAM di Blantyre. I campioni risultati al di sotto del limite inferiore di rilevabilità del metodo *branched-DNA* sono stati successivamente testati mediante un saggio di *nested PCR* "in house" presso i laboratori dell'Università di Milano.

La carica virale di HBV-DNA è stata associata al profilo sierologico specifico di ogni paziente per definirne lo stato di infezione.

Dei 158 campioni con profilo "anti-HBc isolato", 155 sono stati sottoposti a saggio di *branched DNA*, mentre per 3 campioni l'aliquota residua di plasma non era sufficiente per lo svolgimento delle analisi molecolari.

Il 52.9% (82/155) è risultato HBV-DNA positivo, con cariche comprese nel range di determinazione ($2 \times 10^3 - 1 \times 10^8$ cp/ml), mentre il 47.1% (73/155) dei campioni analizzati mostrava valori inferiori alla soglia di rilevabilità della metodica quantitativa.

In Tabella 8 sono riassunti i risultati delle indagini molecolari in tali campioni. Dal momento che dati di letteratura indicano come le infezioni occulte da HBV siano associate a basse cariche virali (< 10000 cp/ml), i campioni in studio sono stati suddivisi, in base alla quantità di DNA virale rilevata, in 3 gruppi: 1) campioni con viremia superiore a 1×10^4 cp/ml; 2) campioni con viremia compresa tra 2000 cp/ml e 1×10^4 cp/ml; 3) campioni con viremia al di sotto del limite inferiore della metodica *branched-DNA* (< 2000 cp/ml).

Carica Virale HBV DNA (copie/ml)(<i>branched</i> DNA)	N° campioni / tot "anti-HBc isolato"	Carica Virale mediana (IQR)
> 1 x 10 ⁴	17/155 (11%)	78004 cp/ml (24671-253687 cp/ml)
2000 - ≤ 1 x 10 ⁴	65/155 (41.9%)	3555 cp/ml (2733-5536 cp/ml)
< 2000	73/155 (47.1%)	-

Tabella 8: Determinazione quantitativa di HBV-DNA in campioni con "anti-HBc isolato"

Per quanto riguarda i campioni HBsAg+ e quindi con profilo sierologico "anti-HBc+/antiHBs-/HBsAg+" il valore mediano di carica virale plasmatica è risultato di 15.929.905 cp/ml (range:2,000-100,000,000 cp/ml).

4.5 Indagini di biologia molecolare condotte presso i laboratori della Sezione di Virologia del Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia dell'Università di Milano

4.5.1 Indagini molecolari effettuate su campioni con profilo sierologico "anti-HBc isolato" risultati al di sotto del limite inferiore di rilevabilità della metodica branched-DNA.

Dei 155 campioni con "anti-HBc" isolato, 73 hanno mostrato valori inferiori al limite di rilevabilità (2000 cp/ml) quando sottoposti a test *branched*-DNA v3.0 per la determinazione quantitativa di HBV-DNA; questi campioni esprimevano tuttavia valori di luminescenza (RLU, *Relative Light Units*) indicativi della presenza, seppure a bassi livelli, di DNA virale.

Si è proceduto quindi con una ulteriore indagine molecolare, un saggio semi-quantitativo di *nested* PCR *in house*, più sensibile rispetto al primo, al fine di confermare la presenza di DNA virale e stimarne la quantità presente.

La procedura ha previsto una prima fase di valutazione della sensibilità della metodica di *nested*-PCR *in house*, effettuata mediante impiego di diluizioni seriali, allestite a partire da un campione a concentrazione nota (350000 copie/ml). In base alle diluizioni testate (350000, 35000, 3500, 350, 35 e 3.5 cp/ml) è stato possibile identificare il limite di rilevabilità della metodica, risultato pari a 350 cp/ml.

Il saggio è stato quindi applicato ai 73 campioni con carica virale <2000 cp/ml ed il 69.9% (51/73) di questi è stato confermato HBV-DNA positivo, con cariche virali stimate >350 cp/ml. Questi 51 campioni sono stati inclusi tra i campioni viremici per HBV.

I restanti 22 campioni (22/73, 30.1%) sono stati invece considerati HBV-DNA negativi (Tabella 9).

Carica Virale HBV DNA (copie/ml) (<i>branched</i> DNA)	N° campioni / Tot "anti-HBc isolato"	<i>In-house</i> PCR (> 350 copie/ml)	Carica Virale mediana (IQR)
> 1 x 10 ⁴	17/155 (11%)		
2000 ≤ 1 x 10 ⁴	65/155 (41.9%)		
< 2000	73/155 (47.1%)	51/73 (69.9%)	650 cp/ml (520-850 cp/ml)
Negativi		22/73 (30.1%)	-

Tabella 9: Determinazione carica virale in campioni con "anti-HBc isolato" dopo applicazione del saggio di PCR

Quindi, per 133 dei 155 (85.8%) campioni con "anti-HBc isolato", è stato possibile rilevare e quantificare il DNA virale presente mediante impiego dei due metodi molecolari.

Di questi, 116 (116/133, 87.2%) mostravano cariche virali < 10.000 cp/ml (HBV VL mediana 2349 cp/ml) ed, in particolare, 65 (56%) avevano cariche virali comprese tra 2000 e 10.000 cp/ml e 51 (44 %) tra 350 e 2000 cp/ml.

Il restante 12.8% (17/133) presentava valori di carica virale > 10.000 copie/ml, con valore mediano pari a 78.004 copie/ml.

In Figura 15 è riportata la sintesi dei risultati ottenuti in seguito alle indagini molecolari: da qui si può evincere come la prevalenza di infezioni occulte da HBV in donne con profilo sierologico "anti-HBc isolato" e carica virale < 10000 cp/ml nella popolazione totale si attesti all'11.6% (116/996).

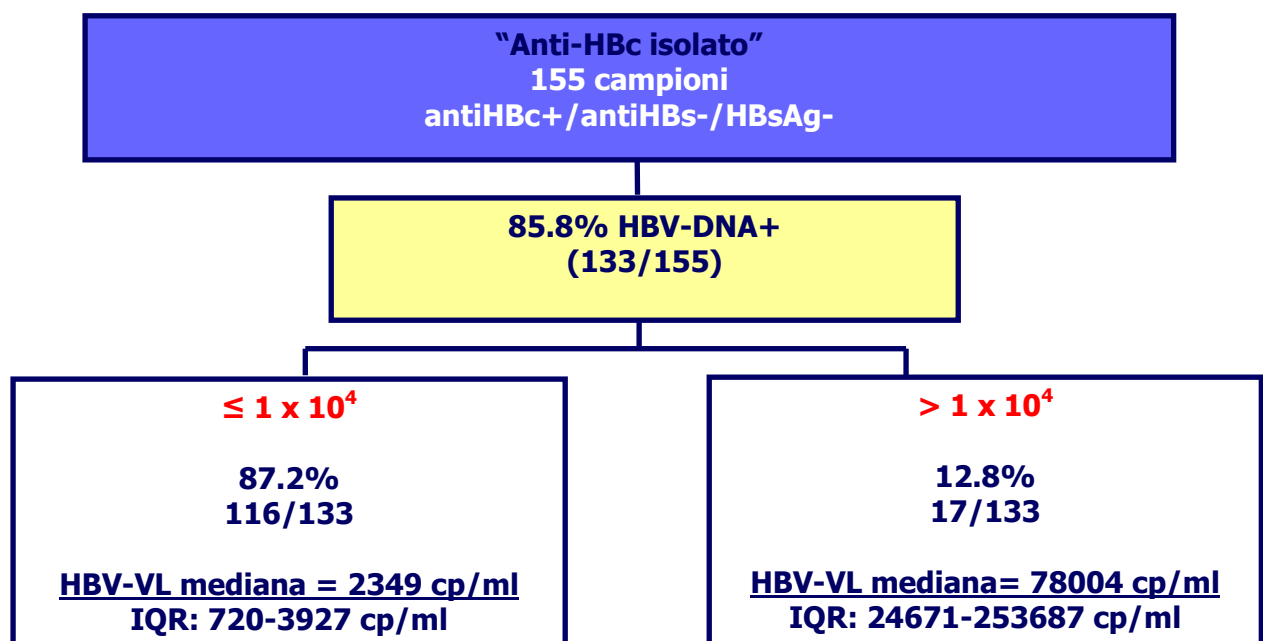


Figura 15: Campioni con profilo "anti-core isolato" HBV-DNA viremici e relativi valori di carica virale

4.5.2 Sequenziamento di una regione del gene S di HBV

L'analisi filogenetica delle regioni pre-S1, pre-S2 e S ha permesso di definire il genotipo in 3 campioni risultati HBV-DNA viremici in studio, come genotipo A. Le sequenze ottenute hanno mostrato un'elevata similarità (98%) con sequenze di riferimento del genoma di HBV presenti nella banca nucleotidica di Blast.

Inoltre l'editing manuale della sequenza ha permesso di individuare in uno dei 3 campioni analizzati la mutazione M204V che in letteratura è considerata una mutazione del gene della retrotrascrittasi caratteristica del trattamento farmacologico con la lamivudina.

4.6 Determinazione di marcatori di infettività in campioni con profilo sierologico "anti-HBc+/anti-HBs+"

I 315 campioni risultati positivi per anti-HBc ed anti-HBs sono stati sottoposti a saggio semi-quantitativo di PCR *in house* per la determinazione di HBV-DNA. Di questi, 80 (25.4%) sono risultati HBV-DNA positivi.

Tali campioni, con profilo "anti-HBc+/anti-HBs+/HBV-DNA+", sono stati sottoposti a test per la rilevazione di HBsAg. Il 18.7% (15/80) è risultato positivo alla rilevazione di HBsAg evidenziando quindi un profilo di positività a tutti e tre i marcatori sierologici di HBV ("anti-HBc+/anti-HBs+/HBsAg+") (Figura 16).

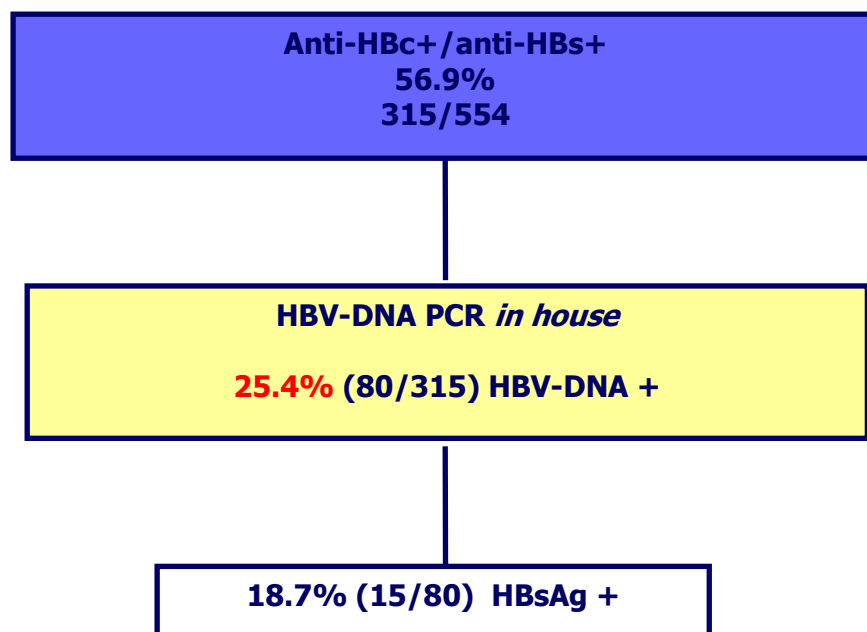


Figura 16: Determinazione marker di infezione in campioni anti-HBc+/anti-HBs+

6. Conclusioni

L'Africa Sub-Sahariana è considerata una delle aree dove l'Epatite B è endemica, con elevata prevalenza nella popolazione: l'infezione è frequente nei bambini, che presentano spesso marcatori sierologici di infezione pregressa o cronica, e nella popolazione adulta, dove la frequenza di portatori di HBsAg supera, in molte zone, il 10% [80]. Precedenti studi effettuati in Sud Africa su donne in gravidanza HBV-infette non hanno individuato nella trasmissione perinatale la modalità più rilevante di infezione nei bambini. Tale modalità di trasmissione risulta invece più frequente nelle donne con co-infezione HIV/HBV [81]. L'immunosoppressione correlata ad HIV aumenta infatti la replicazione virale e, di conseguenza, la carica virale di HBV e la possibilità di trasmissione. Nel contesto africano, così gravemente colpito dalla pandemia HIV, la co-infezione HIV/HBV comporta quindi un aumentato rischio di trasmissione per via verticale/perinatale di HBV.

Secondo UNAIDS, la stima del numero di persone viventi in Malawi con HIV/AIDS si attestava, nel 2009, attorno ad un valore di 920.000 persone. La prevalenza di infezione tra gli adulti in fascia di età 15-49 anni era pari all'11%, con un numero approssimativo di bambini orfani di uno od entrambi i genitori, a causa di tale patologia, di oltre 650.000.

In Malawi, la maggioranza della popolazione vivente con infezione da HIV è costituita da donne, che sono stimate essere il 58% degli 800.000 adulti HIV positivi presenti nel Paese [84].

Riguardo invece l'infezione da virus dell'epatite B (HBV) in Malawi, ad oggi i dati di prevalenza sono esigui, così come non è nota la frequenza della co-infezione HIV/HBV. Studi effettuati in alcune aree del Paese hanno rilevato una prevalenza di portatori di HBV in una popolazione di donne gravide pari al 13% [85]. Uno studio condotto nella regione montana di Ntcheu ha dimostrato, attraverso uno screening sierologico, l'elevata endemia delle infezioni da HIV e HBV, con una prevalenza di portatori pari all'8%, e una frequenza di co-infezioni da HIV/HBV pari all'1.2% nella popolazione studiata [86].

Il genotipo di HBV prevalente in Malawi è il genotipo A ed, in particolare, il sottogruppo A1 è stato rilevato mediante sequenziamento di diversi isolati virali. Riguardo l'antigene di superficie HBsAg, sono stati identificati come circolanti i sottotipi *adw2* e *ayw2* [87, 88].

Uno altro studio condotto su pazienti ricoverati presso il Queen Elizabeth Hospital di Blantyre, il più grande ospedale del Paese, ha evidenziato un elevato tasso di co-infezione HIV/HBV (20.4%) tra i pazienti presi in esame, con una prevalenza di portatori di HBV pari al 17.5%. Questi dati rilevano come la co-infezione HIV/HBV possa avere un rilevante impatto sul trattamento con terapia antiretrovirale indicato per i pazienti HIV positivi [89].

Lo studio più recente condotto in Malawi ha fornito un dato di frequenza di co-infezione HIV-HBV pari al 6.7% in una coorte di pazienti arruolati in programmi di terapia ART [90].

In questo contesto, il presente lavoro di ricerca, oggetto della tesi di dottorato, si è inserito con l'obiettivo di caratterizzare l'infezione da virus dell'epatite B (HBV) in Malawi in una coorte di donne HIV positive afferenti presso i centri di salute del programma DREAM sostenuto dalla Comunità di Sant'Egidio di Roma.

In particolare ci si è proposti di valutare la prevalenza di infezione da HBV in donne HIV sieropositive, data la mancanza di dati esaustivi in letteratura sulla diffusione di tale infezione in Malawi ed, in particolare, sulla frequenza di co-infezioni HIV/HBV [85, 86, 89].

Un ulteriore obiettivo è stato quello di valutare la frequenza di infezioni "occulte" da HBV nella coorte di studio. L'infezione occulta da virus dell'epatite B è definita come la persistenza del genoma virale nel tessuto epatico, e in alcuni casi anche nel siero, spesso in quantità non rilevabili, in individui HBsAg negativi. Durante l'infezione occulta la carica virale è generalmente inferiore alle 10^4 copie/ml [54]. Lo stato di infezione occulta

sembrerebbe principalmente causato dalla soppressione della replicazione e dell'espressione genica virale [56]. Ad oggi non esistono dati relativi alla frequenza di infezione occulta da virus B in Malawi. Attualmente la diagnosi di infezione da HBV viene effettuata in Malawi solo per pazienti sintomatici che accedono alle maggiori strutture sanitarie del paese. Solitamente l'infezione da HBV è diagnosticata quando il marcatore sierologico HBsAg circolante è rilevato. Tuttavia l'avvento di tecniche di biologia molecolare ha permesso di identificare l'infezione occulta da HBV anche in soggetti negativi per HBsAg con o senza anticorpi circolanti anti-HBc e/o anti-HBs.

Dati bibliografici presentano prevalenze contrastanti riguardo i casi di infezione da HBV "occulta" in soggetti immunocompromessi, non definendo le reali dimensioni e le caratteristiche specifiche del problema [159, 160]. Per il Malawi, in particolare, non si hanno informazioni riguardo l'infezione occulta da HBV, il cui impatto potrebbe essere invece rilevante, soprattutto per le pazienti in trattamento HAART.

La conoscenza del problema legato all'infezione da HBV, visto nella globalità delle sue implicazioni, ha come obiettivo ultimo quello di fornire le basi per l'implementazione di strategie diagnostiche e preventive nei confronti dell'epatite B in Malawi. Un ritorno concreto, quindi, a favore dei pazienti afferenti al programma DREAM che, in Malawi, sono più di 10.000.

DREAM è presente in Malawi con 11 Centri di salute, di cui 3 principali (Blantyre, Balaka e Lilongwe) e 8 satelliti, con 4 laboratori di biologia molecolare. Con questa struttura operativa e con personale sanitario locale interamente impiegato nella sua conduzione, DREAM è riuscito ad essere il punto di riferimento del Paese per la prevenzione e la cura dell'infezione da HIV e continuerà nella sua opera con l'intenzione di inserirsi sempre di più nel sistema sanitario pubblico locale e diventarne parte a tutti gli effetti.

I servizi di cura e assistenza DREAM sono completamente gratuiti ed i pazienti accettati all'interno del programma vengono seguiti per tutta la loro vita.

Il presente lavoro di ricerca è nato con l'intenzione di supportare il servizio garantito dal programma DREAM in Malawi fornendo informazioni utili (e carenti a livello di letteratura internazionale) sullo stato dell'infezione da HBV in pazienti HIV positivi, particolarmente rilevanti considerando come la maggioranza dei pazienti DREAM siano sottoposti a terapia HAART e siano quindi a rischio di complicanze se contemporaneamente infetti da virus dell'epatite B.

Il disegno dello studio ha previsto una complessa fase preparatoria iniziale che ha comportato l'individuazione dei possibili soggetti eligibili, oltre 1000 donne HIV positive, e la verifica dell'eventuale disponibilità, all'interno della sieroteca DREAM conservata a -80°C presso i laboratori di biologia molecolare DREAM di Blantyre, Balaka e Lilongwe, di aliquote di plasma per ognuna delle pazienti considerate.

Lo studio, affinché fosse attuabile, ha inoltre previsto la richiesta di autorizzazione da parte del comitato etico malawiano, il *National Health Sciences Research Committee* (NHRSC) con sede a Lilongwe presso il Ministero della Salute del Malawi. Una sintesi del progetto, degli obiettivi e dei risultati attesi è stata preparata e sottoposta a esame secondo la procedura richiesta. Sono state inoltre prodotte due schede per il consenso informato in lingua inglese e chichewa da sottoporre alla pazienti eligibili nello studio.

Una volta ottenuta l'autorizzazione, ha potuto prendere forma la parte operativa, tramite la pianificazione di una Flow Chart (Figura 12) relativa alle indagini sierologiche e molecolari atte alla caratterizzazione dell'infezione da HBV nei campioni di plasma raccolti dalle donne HIV positive afferenti ai centri DREAM di Blantyre, Balaka e Lilongwe incluse nello studio.

Un totale di 1006 donne ha acconsentito ad entrare nello studio ed i rispettivi campioni di plasma sono stati quindi testati per la rilevazione di marcatori sierologici e molecolari di HBV.

La percentuale di soggetti positivi per anticorpi anti-HBc è risultata del 56.3%, in assenza di danno epatico (mediana ALT: 16 U/l, IQR 11.5-23.0 U/l) e con carica virale media di HIV di 4,23 Log cp/ml (range 3,19 - 4,88 Log cp/ml). Questo dato evidenzia il forte impatto dell'infezione da HBV sulla popolazione in esame: più del 50% delle donne è stata esposta al virus dell'epatite B nel corso della propria vita.

La circolazione del virus non sembra essere omogenea nel Paese, dal momento che sono state riscontrate differenze statisticamente significative nella frequenza di soggetti anti-HBc positivi tra gli afferenti al centro di Balaka rispetto a quelli del centro di Blantyre (66.7% vs 57.5%, $p < 0.05$) e di Lilongwe (66.7% vs 48,1%, $p < 0.001$).

La determinazione dell'antigene di superficie (HBsAg) ha rilevato come il 34% circa dei soggetti anti-HBc positivi/anti-HBs negativi presentasse tale marcatore. Estrapolando tale dato alla popolazione totale inclusa nello studio, la prevalenza di soggetti portatori di

HBsAg risulta dell'8.3%, in linea con quella evidenziata nei Paesi definiti ad "alta endemia" (prevalenza $\geq 8\%$).

La frequenza di donne HBsAg positive è risultata significativamente più elevata ($p < 0.05$) nelle coorti di Blantyre e di Lilongwe ((38.4% e 40%, rispettivamente) rispetto a quella di Balaka (23.6%).

Sembrerebbe quindi che il virus circoli più frequentemente nell'area di Balaka (area geografica di tipo rurale), ma che le popolazioni attorno ai centri di Blantyre e Lilongwe siano a maggior rischio di progressione verso la forma cronica dell'infezione.

Tra i soggetti anti-HBc+/anti-HBs-, il 65.6% è risultato negativo alla determinazione di HBsAg, presentando quindi il profilo sierologico "anti-HBc+/anti-HBs-/HBsAg-", definito come "anti-core isolato". Nella popolazione studiata, questo stato sierologico era più frequente ($p < 0.05$) nella coorte di pazienti DREAM di Balaka (76.4%) rispetto alle coorti di pazienti di Blantyre (61.6%) e Lilongwe (60%).

Tale profilo potrebbe essere associato ad una pregressa infezione, dove l'unico marcatore rimasto in circolo a distanza di tempo dall'avvenuta infezione è costituito dagli anticorpi anti-HBc, oppure ad una infezione ancora in atto sostenuta da virus che, per motivi ancora non del tutto chiariti, non sono in grado di esprimere la proteina di superficie S a livelli quantificabili o tale da essere identificata gli attuali metodi diagnostici. In questo secondo caso quindi l'"anti-core isolato" potrebbe essere indicativo di uno stato di "epatite B occulta" [161].

Dati di letteratura indicano [162] come l'epatite occulta sia caratterizzata dalla presenza del DNA virale, come marcatore di attiva replica e di infettività, a livelli tali (< 10000 cp/ml) da non portare all'espressione di quantità rilevabili delle proteine di superficie. L'indagine molecolare condotta sui campioni in studio con due diverse metodiche, ha rilevato come in circa l'86% di questi fosse presente il DNA di HBV; questo dato è in linea con studi in letteratura che riportano come fino all'85% di pazienti HIV-infetti con "antiHBc isolato" siano positivi per DNA virale [163].

Riguardo la determinazione quantitativa di HBV-DNA, l'87% dei campioni con "anti-HBc isolato" mostrava cariche virali < 10.000 cp/ml (mediana 2349 cp/ml); in particolare, il 56% era compreso tra 2000 e 10.000 cp/ml, mentre il 44% tra 350 e < 2000 cp/ml. Tali

risultati permettono di considerare le rispettive 116 donne HIV+ come portatrici di infezione occulta da HBV, rientrando perfettamente nei criteri definiti in merito dagli *Statements* di Taormina del 2008 [164].

Il restante 13% (17 campioni) mostrava valori di carica virale >10.000 cp/ml (mediana 78.004 cp/ml), rendendo quindi difficile comprendere come in questi casi non si sia riusciti ad evidenziare in circolo la presenza di HBsAg.

Una possibile ipotesi al riguardo potrebbe riguardare la presenza di mutazioni a livello del gene S del DNA virale, tali da comportare l'espressione di varianti dell'antigene di superficie non rilevabili mediante le comuni metodiche di analisi sierologica. Questa ipotesi necessiterà tuttavia di ulteriori approfondimenti mediante analisi della sequenza genica ottenuta dai campioni in studio.

Al momento, l'analisi filogenetica delle regioni pre-S1, pre-S2 ed S condotta su alcuni campioni con cariche virali >10000 cp/ml ha permesso di definire il genotipo di HBV infettante come genotipo A, confermando i dati di letteratura [87,88] che riportano come tale genotipo sia il più diffuso in Malawi.

E' stato inoltre possibile individuare, mediante editing delle sequenze analizzate, la mutazione M204V in un campione. In letteratura tale mutazione è associata al trattamento farmacologico con lamivudina.

Il sequenziamento genico, per ora condotto solo su alcuni campioni, può quindi considerarsi un valido supporto per valutare i ceppi di HBV circolanti in Malawi, la presenza di farmaco-resistenze o mutazioni in grado di inibire l'espressione di HBsAg o cambiarne le caratteristiche antigeniche rendendo impossibile la sua rilevazione da parte dei saggi sierologici commerciali.

Alcuni dati in letteratura [165] riportano la presenza di infezioni occulte da HBV anche in soggetti con profilo sierologico "anti-HBc+/anti-HBs+", normalmente indicativo di risoluzione dell'infezione, in quanto gli anticorpi anti-HBs sono associati alla risposta immunitaria protettiva. Abbiamo quindi voluto valutare l'eventuale presenza del marcatore di attiva replica (HBV-DNA) nei campioni in studio riscontrati positivi per anti-HBc ed anti-HBs.

Nella nostra casistica, 80 campioni sono risultati HBV-DNA positivi. Ulteriori studi sono necessari per valutare la carica virale di HBV al fine di individuare la quota di soggetti con possibili infezioni occulte all'interno di questo gruppo di pazienti. Dovrà essere anche

determinato il livello di anticorpi anti-HBs presenti in rapporto alla soglia di protezione (10 mIU/ml), in modo da poter chiarire il significato del profilo sierologico "anti-HBc+/anti-HBs+/HBV-DNA+".

In conclusione, i risultati ottenuti nel presente lavoro hanno permesso di stimare, nella popolazione in studio, una prevalenza di infezioni occulte da HBV, con profilo sierologico "anti-HBc isolato", del 12% circa (116/996).

Questo dato, il primo disponibile per il Malawi, appare di particolare rilevanza, in quanto sottolinea come le indagini molecolari risultino indispensabili per l'identificazione e la caratterizzazione dell'infezione da HBV, in particolare per pazienti infetti da HIV, dal momento che lo stesso HIV può condizionare la rilevazione dei marker sierologici di infezione di HBV.

Nel contesto africano, dove l'HIV è così diffuso, appare necessario pensare ad una revisione ed implementazione delle strategie diagnostiche, in modo da poter valutare correttamente la presenza di infezione da HBV, soprattutto nella popolazione femminile adulta. Solo così si riuscirebbe a fornire un valido supporto ad opportune strategie di prevenzione mirate al contenimento della trasmissione dell'infezione da HBV da madre e figlio.

Uno sviluppo futuro del presente lavoro prevede la caratterizzazione dell'infezione da HBV in bambini HIV positivi assistiti dal programma DREAM. In Malawi il programma EPI (*Expanded Programme on Immunization*) supportato da WHO, UNICEF e GAVI (*Global Alliance for Vaccines and Immunizations*) ha introdotto nel gennaio 2002 la vaccinazione contro l'epatite B con la somministrazione di un vaccino pentavalente (DPT-HepB-Hib) a bambini al di sotto dell'anno di età. Il report EPI assicura una copertura vaccinale sul territorio malawiano superiore all'80%. Sono rimasti però scoperti dall'intervento di immunizzazione di massa tutti i soggetti nati prima del gennaio 2001 (bambini >6 anni). Risulta pertanto importante stimare la reale diffusione dell'infezione da HBV in Malawi, negli anni successivi all'introduzione di programmi di vaccinazione di massa (EPI). I dati ottenuti saranno utili per l'individuazione di strategie preventive mirate nell'ambito del programma DREAM.

6. Allegati

ALLEGATO 1

COPIA DEL PROGETTO PRESENTATO AL FINE DELL'APPROVAZIONE DA PARTE DEL National Health Sciences Research Committee (NHRSC), COMITATO ETICO CON SEDE A LILONGWE PRESSO IL MINISTERO DELLA SALUTE MALAWIANO.



**THE EVALUATION OF HIV/HBV CO-INFECTIONS AMONG
HIV POSITIVE PATIENTS IN THE DREAM
(DRUG RESOURCE ENHANCEMENT AGAINST AIDS AND
MALNUTRITION) PROGRAM IN MALAWI**

Malawi:
Lilongwe P.O. Box Post Dot Net n. X 207
Tel/fax. 01 751477
E-Mail: segidiolil@globemw.net

Italy:
Rome - Piazza S.Egidio, 3/a – 00153
Tel +39 06.58.56.61 – Fax +39 06.58.83.625
E-mail: info@santegidio.org

Abstract

Background: Infections with blood-borne virus such as hepatitis B (HBV) and HIV cause substantial mortality and morbidity worldwide, but few studies have focused on the interactions between these viruses in resource limited settings.

So far data about the real HBV prevalence in Malawi and the frequency of HIV/HBV infections are not available.

DREAM (*Drug Resource Enhancement against AIDS and Malnutrition*), an holistic-approach program for treating People Living with HIV/AIDS in Africa, was launched in Mozambique in early 2002 [11]. Since then, the DREAM program expansion involved several African countries (Malawi, Tanzania, Kenya, Republic of Guinea, Guinea Bissau, Nigeria, Angola, Democratic Republic of the Congo, Cameroon), where many treatment centres and molecular biology laboratories have been set up.

The aim of DREAM is to combine prevention and pharmacological treatment of AIDS in Sub-Saharan Africa, as happens in Western countries that's why DREAM has included the development of highly specialized molecular biology labs . DREAM is free-of-charge and completely accessible.

DREAM in Malawi started in 2005 and now it is present with 3 main centres in the areas of Blantyre, Balaka and Lilongwe and several satellite centres.

The general purpose of this project is to study the HBV infection prevalence and the related clinical and therapeutic impact in HIV positive patients (about 1,000 women included in the program) receiving HAART at the DREAM centres in Malawi.

Moreover in this study we will examine occult HBV infection prevalence in a group of immune-compromised patients who will present "anti-HBc alone" serological pattern (anti-HBc+/anti-HBs-/HBsAg-). Possible correlations will be investigated between the prevalence of HBV-DNA, viral loads, CD4 levels and previous Lamivudine administration in this group of patients.

Methods: This is a retrospective study laboratory-based study, using stored (-80° C) plasmas that will be collected from patients admitted at the DREAM centres of Blantyre, Balaka and Lilongwe in Malawi. Testing for anti-HBc, anti-HBs and HBsAg will be performed with enzyme immunoassays (Abbot/Murex). Samples resulted with a "anti-HBc alone" serological pattern will be tested to detect HBV-DNA. All these samples will be then tested to evaluate HBV DNA viral load.

Inclusion criteria: Female patients will be eligible for the study if they fill the following criteria: age > 15 years, documented HIV infection, available file at DREAM centre and available samples stored

Sample size: Sample size has been calculated, using EpiInfo program, referring to the expected incidence rate of the event (co-infection HIV/HBV) in the country (10%) :a total of 999 patients subdivided equally in the three different DREAM centres (Blantyre, Balaka and Lilongwe) will be included in this study.

Ethical considerations: The proposed study doesn't require the direct involvement of the patients neither the introduction of new procedures not in use in the DREAM centres at the moment except for the informed consent that must be requested.

However the relevance, concerning the public health, of the informations that are aim of the study appears so high to justify the proposal.

Dissemination of findings: A final report for each study will be produced. The report will be delivered to the Ministry of Health to disseminate the results.

1. Background and justification

Infections with blood-borne virus such as hepatitis B (HBV) and HIV cause substantial mortality and morbidity worldwide, but few studies have focused on the interactions between these viruses in resource limited settings. An estimated 350 million people suffer from chronic HBV infection [1], with 620,000 dying annually from complications [2]. The WHO estimates that of the 40 million people infected with HIV, 63% live in sub-Saharan Africa [3], where the prevalence of HBV infection is described as 10-20% (high endemic areas considered if prevalence $\geq 8\%$), compared to 0.2-0.5% in developed countries [4].

So far data about the real HBV prevalence in Malawi and the frequency of HIV/HBV infections are not available. The proposed research is aimed at the epidemiological, clinical and therapeutic impact of the HBV infection on HIV positive patients, in order to improve intervention strategies .

2. Literature review

Since the first clinical evidence of the Acquired Immunodeficiency Syndrome (1981), AIDS became one of the most devastating illness that humanity had to face. From the beginning of the pandemic, more than 60 million people were infected by HIV (Human Immunodeficiency Virus) and this pathology caused more than 25 million deaths (fourth death cause in the world). Sub-Saharan Africa remains the most affected region in the global AIDS epidemic. More than two thirds (67%) of all the HIV-positive people live in this region where more than three quarters (75%) of all AIDS deaths in 2007 occurred. It has been estimated that 1.9 million (range: 1.4 million-2.4 million) people were newly infected with HIV in 2007, bringing to 22 million (range: 20.9 million-24.3 million) the total number of people living with the virus. Unlike other regions, the majority of people living with HIV in sub-Saharan Africa (61%) are women [5, 6].

Malawi, a sub-Saharan country landlocked by Mozambique, Tanzania and Zambia, is one of the poorest countries in the world. AIDS has had a particularly devastating impact on this country. Since the first case was diagnosed in 1985, an estimated 650 000 Malawians have died of HIV-related illnesses [7]. In 2007, HIV prevalence among adults aged 15–49 was 14.1% [8] , and approximately 500 000 children lost one or both parents because of AIDS in 2003 [9] . The majority of people living with HIV in Malawi are women, estimated to be 58% of the 810 000

adults living with HIV [8]. Vulnerability to HIV remains high due to the compounded effects of poverty, low education levels, discriminatory practices against girls and women, poor farming methods and drought [10].

2.1 The DREAM program

DREAM (*Drug Resource Enhancement against AIDS and Malnutrition*), an holistic-approach program for treating People Living with HIV/AIDS in Africa, was launched in Mozambique in early 2002 [11]. Since then, the DREAM program expansion involved several African countries (Malawi, Tanzania, Kenya, Republic of Guinea, Guinea Bissau, Nigeria, Angola, Democratic Republic of the Congo, Cameroon), where many treatment centres and molecular biology laboratories have been set up.

The aim of DREAM is to combine prevention and pharmacological treatment of AIDS in Sub-Saharan Africa, as happens in Western countries.

For many years, intervention models acting against HIV infection in Africa were nearly wholly preventive. But prevention alone did not work. The progression of the epidemic throughout the continent is a proof of this. It is not by mere chance that in the North of the world, prevention and treatment go hand in hand.

DREAM is free-of-charge. It is crucial that all the health services provided (from diagnostics to nutritional support, to health education and conventional treatment of opportunistic infections) be offered free-of-charge.

In Africa, one pressing problem to be overcome is that it is extremely difficult for people to access health centres, especially in rural areas. And this is another feature of DREAM which cannot be renounced: accessibility. DREAM does not merely strive to welcome those who come to ask for treatment, but encourages adherence by offering adequate nutritional support and an apposite “home care” service, which reaches in their homes those patients who are at risk of being lost [12, 13].

An original aspect of the DREAM program is caring for pregnant women in accordance with the Mother & Child Prevention & Care (MCPC) scheme. Care for mothers is one of the special features of the model proposed through DREAM. In fact, the offer of triple therapy to mothers – which is not interrupted but continues until six months after delivery allowing the mothers to breastfeed – is essential. Mother’s health is a top priority, that’s why DREAM provides triple

therapy, the best way to reduce maternal mortality among HIV positive pregnant women and preserve their health after delivery. [14]. On the other hand, it is well known that in Africa, the survival of orphaned children, even HIV negative ones, is lower than that of other children. They also have fewer possibilities to attend school. Thus, not only is the vertical transmission of the infection prevented, but a mechanism of survival – and of increased chances for and during life – is created for the newborn and the entire family.

In a long term perspective to maximize its effectiveness antiretroviral treatment requires strong lab support. This is why the DREAM program has included the development of highly specialized molecular biology labs, where the CD4+ count and the viral load measurement (in accordance with the indications of the diagnostic and therapeutic protocols), in addition to the basic biochemistry and haemochrome, are regularly performed, acting as the technological core of the whole program. Labs of this kind are needed in order to respond quickly and effectively to the development of drug-resistant viral strains. This is an investment for the country's future, both in training highly specialized human resources and in equipment [15]. DREAM in Malawi started in 2005 and now it is present with 3 main centres in the areas of Blantyre, Balaka and Lilongwe and several satellite centres.

2.2 Co-infection HBV/HIV

It is known that infection caused by epathotropic viruses like the Hepatitis B virus (HBV) in HIV positive patients increase the risk of cirrhosis, liver insufficiency and mortality especially in patients with a low CD4 level. Notably HIV/HBV co-infected patients have a higher risk to develop a chronic infection and higher HBV-DNA levels [16]

The Hepatitis B Virus and the Human Immunodeficiency Virus share the same ways of transmission: exposure to blood and blood products, sexual and vertical transmission [17].

The introduction of antiretroviral drugs and the wide availability of primary prophylaxis for the most frequently occurring opportunistic infections, has prolonged the asymptomatic period and the survival in HIV-infected people. As a consequence chronic viral liver disease, in particular chronic hepatitis, has become one of the most frequently seen illnesses among HIV positive patients. In addition, chronic hepatitis seems to present a more accelerated course in HIV-positive individuals, progressing to cirrhosis and liver failure in a shorter period of time [18].

In Malawi vaccination for HBV in children (≤ 1 year old) was introduced in January 2002 by the EPI programme (*Expanded Programme on Immunization*) supported by WHO, UNICEF and GAVI (*Global Alliance for Vaccines and Immunizations*).

HBV infection is usually diagnosed when circulating HBsAg is detected. However, the availability of highly sensitive molecular biology techniques has also allowed the identification of HBV infection in HBsAg negative individuals, with or without circulating antibodies to HBsAg (anti-HBs) and/or hepatitis B core antigen (anti-HBc) [19].

The failure to detect HBsAg, despite the persistence of the viral DNA, is due in most cases to the strong suppression of viral replication and gene expression that characterizes this “occult” HBV infection [20-23]; although the mechanisms responsible for suppression of HBV are not well understood.

Occult HBV infection has been studied in selected groups or individuals in which its prevalence is believed to be higher, such as patients co-infected with human immunodeficiency virus (HIV) or hepatitis C virus (HCV) [24].

However the magnitude and pattern of occult HBV infection among immune-compromised patients is not well established yet. In HIV-positive patients, co-infection with HBV and HCV is in general due to the common route of transmission of these diseases. In patients co-infected with HBV and HIV, it has been suggested that HIV interferes with the natural history of HBV infection by enhancing HBV replication [25] and that immune-suppression associated with HIV infection allows re-infection or reactivation of a past HBV infection [26, 27].

The general purpose of this project is to study the HBV infection prevalence and the related clinical and therapeutic impact in HIV positive patients (about 1,000 women included in the program) receiving HAART at the DREAM centres in Malawi.

Moreover in this study we will examine occult HBV infection prevalence in a group of immune-compromised patients who will present “anti-HBc alone” serological pattern (anti-HBc+/anti-HBs-/HBsAg-).

Possible correlations will be investigated between the prevalence of HBV DNA, viral loads, CD4 levels and previous Lamivudine administration in this group of patients.

3. Hypotesis

Prevalence of HBV/HIV co-infection stands at 10%

4. Objectives

4.1 Primary objective

- a) To evaluate the HBV infection prevalence and the related clinical and therapeutic impact in HIV positive patients receiving HAART at the DREAM centres in Malawi.

4.2 Secondary objectives

- a) To examine occult HBV infection prevalence in the group of immune-compromised DREAM patients who will present an "anti-HBc alone" serological pattern.

5. Methodology

A retrospective randomized analysis of the files of the patients followed in the DREAM centres in Malawi will be conducted. Clinical data will be obtained from the patients' files and laboratory exams will be conducted on stored samples. New samples for the purpose of the study will be not taken.

Laboratory exams

Serological and Virological assessment, as well as antibodies against HBV and HBV-DNA viral load, will be undertaken in the DREAM laboratory in Blantyre.

HBV DNA qualitative detection will be undertaken at the laboratory of the Department of Public Health-Microbiology-Virology, University of Milan (Italy), through a nested "in house" PCR method.

Samples from the other DREAM centres of Balaka and Lilongwe will be gathered and transferred to the Blantyre DREAM centre, which will provide storage and processing facilities.

Cold chain using dry ice, will be used for transport of serological and virological samples.

Analysis will be performed starting from patients' plasma samples already in stock in the – 80 degrees freezers present in the 3 DREAM laboratories.

Testing for anti-HBc, anti-HBs and HBsAg will be performed with enzyme immunoassays (Abbot/Murex). All samples will be tested according to the manufacturer's instructions. The samples will be considered positive when absorbance is greater than the cut-off value.

The samples that will result with an "anti-HBc alone" serological pattern will be tested in Italy from DNA extracts obtained in Malawi, through a nested "in house" PCR method to detect HBV-DNA. Malawian personnel will be involved in analysing samples in Italy as part of Capacity Building.

All these samples and all the resulted HBsAg-positive samples will be then tested in Malawi, for the detection of the HBV DNA viral load.

Viral load assessment will be performed with System 340 Siemens Diagnostics using the branched-DNA technology (kit HBV versant 3.0- detection limit 2000-100.000.000 copies DNA/ml).

5.1 Study sites

- a) DREAM centre in Mtengo wa Nthenga Hospital (Dowa District)
- b) DREAM centre in Balaka
- c) DREAM centre in Blantyre (Mandala Area)

5.2 Study subjects

HBV infection prevalence evaluation

All the HIV women's (accessing DREAM centers) plasma samples present in the seroteque at -80 degrees until the defined sample size is achieved . Plasma samples to be tested will be equally collected in the three different centres: Blantyre, Balaka and Lilongwe.

5.3 Sample size

Expected incidence rate of the event (co-infection HIV/HBV):	10%
Minimal increase detection	6%
Power	95%
Alpha (2-tailed)	5%
Sample size	999

5.4 Inclusion and exclusion criteria

Patients will be eligible for the study if they fill the following criteria:

- females
- age > 15 years
- documented HIV infection
- available file at DREAM centre and available samples stored

5.5 Ethical Considerations

The proposed study doesn't require the direct involvement of the patients neither the introduction of new procedures not in use in the DREAM centres at the moment except for the informed consent that must be requested.

However the relevance, concerning the public health, of the informations that are aim of the study appears so high to justify the proposal.

5.6 Limitations or constraints

As in every retrospective study the main limiting factor inbuilt in the study could be related to the lack of a collection of informations scheduled before the study itself.

It will be possible that, during the study, the lack of specific data not present in the patients' files could emerge.

5.7 Data collection, management and analysis

Data related to patients included in the study will be collected from the local personnel in each centre. Laboratory analysis will be conducted at the DREAM centre in Blantyre by local staff in collaboration with expatriate personnel.

Local personnel will be adequately trained to use the required technologies for the analysis.

Data entry will respect anonymity; the data will be entered in a electronic format, using an identification number to allow for tracking of the original file should the need arise, and transmitted through data transmission channels or with computer support. The

DREAM centre in Blantyre will be the centre for the collation of all information. The analysis of information will be undertaken using the SPSS computer package.

6. Dissemination of findings

A final report for each study will be produced. The report will be delivered to the Ministry of Health to disseminate the results.

7. Personnel

Prof. Leonardo Palombi (Professor of Epidemiologist and Public Health at the University of Rome “Tor Vergata”; Scientific Director of the DREAM program, Community of Sant’Egidio) is responsible for design of the study, supervision of the research team, supervision of statistical analysis, interpretation of results and writing the reports

Dr. Giuseppe Liotta (PhD in Epidemiology and Microbiology, University of Rome “La Sapienza”; Researcher in Public Health at Dept of Public Health, University of Tor Vergata – Rome; Malawi DREAM program National coordinator, Community of Sant’Egidio) is responsible for gathering of field data, interpretation of results and writing the reports

Dr. Davide Brambilla (PhD in Public Health, Dep. Of Public Health-Microbiology-Virology, section of Virology, University of Milan; Malawi DREAM lab supervisor, DREAM program Community of Sant’Egidio) is responsible for gathering of data, data analysis, laboratory analysis and training the lab technicians, production and interpretation of results and writing the reports

Dr. Susanna Ceffa (PhD in Molecular and Experimental Oncology University of Pisa; General Laboratory Advisor, DREAM Program Community of Sant’ Egidio) is responsible for coordination of DREAM lab activities and oversight of investigation implementation

Dr. Richard Luhanga (Master of Science in Biological Sciences, Chancellor College, University of Malawi; Biological Laboratory Technician, DREAM Centre Blantyre)

is responsible for identifying the eligible samples, sample analysis, production of and data entry

Mr Jere Haswell (Diploma in Clinical Medicine, Malawi College of Health Sciences) is responsible for extraction of data and consenting patients at the Blantyre DREAM centre

Mr Darlington Thole (Diploma in Clinical Medicine, Malawi College of Health Sciences) is responsible for extraction of data and consenting patients at the Balaka DREAM centre

Mr Martin Maulidi (Diploma in Clinical Medicine, Malawi College of Health Sciences) is responsible for extraction of data and consenting patients at the Lilongwe DREAM centre

8. Work-plan

- 1-31.08.2009**
- Launch gathering of data in DREAM centres in Blantyre, Balaka and Lilongwe
 - Identification of eligible patients to be included in the studies with an available sample in the plasma stock.
 - Standardization of data gathered
- 1-31.09.2009**
- Stored plasmas collection in three different DREAM centres
 - Data collection after analysis at the Blantyre DREAM laboratory
- 1-31.10.2009**
- Study and organization of the collected data
 - Epidemiological data analysis on HIV-HBV co-infection
 - Production of the final report

9. Budget

ACTIVITIES	QUANTITY	UNITARY COST (\$)	TOTAL COST (\$)
Analysis' reagent			
ELISA kits all the ELISA kit were donated by ABBOTT Italia			
antiHBc	12		
antiHBs	6		
HBsAg	3		
bDNA HBV v 3.0 kit	3	2070 \$	6200 \$
Lab and Data analysis and reports	Mission/man	1200 \$	1200 \$
Analysis and production of data	3 months/man	700 \$	2100 \$
Extraction of data	3 months/man	800 \$	2400 \$
			11900 \$

10. Bibliography

- [1] Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004;11:97e107.
- [2] Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol* 2005;34:1329e39.
- [3] UNAIDS/WHO. AIDS epidemic update: December 2006. Geneva: UNAIDS; 2006.
- [4] Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, Poynard T. Viral hepatitis B. *Lancet* 2003;362:2089e94.
- [5] UNAIDS/WHO. Epidemic Update 2007
- [6] UNAIDS/WHO. *AIDS Global Report 2008*. UNAIDS publication
- [7] *Malawi Country Profile*. www.Avert.org.
- [8] UNAIDS (2007). *Malawi Country Profile 2007*. Geneva, UNAIDS.
- [9] UNAIDS (2004). *Epidemiological Fact Sheet on HIV/AIDS and Sexually Transmitted Diseases: Malawi, 2004 update*. Geneva, UNAIDS.
- [10] Office of the President and Cabinet (2005). *Malawi HIV and AIDS Monitoring and Evaluation Report 2005. Follow-up to the Declaration of Commitment, Department of Nutrition HIV and AIDS (UNGASS)*. Lilongwe, Government of Malawi, December 2005.
- [11] G Liotta, E Buonomo, G Creton, L Emberti Gialloreti, M Magnano, M.C. Marazzi. *A home care program for people living with AIDS in Mozambique*. XII Int. Conf. on AIDS and STDs in Africa. Ouagadougou, 9-13 dec. 2001; Abstract book p.21
- [12] Magnano San Lio M, Mancinelli S, Palombi L, Buonomo E, Doro Altan A, Germano P, Abdul Magid N , Pesaresi A, Renzi E, Scarcella P, Zimba I, Marazzi MC *The DREAM model's effectiveness in health promotion of AIDS patients in Africa*. *Health Promotion International* 2009, 24 (1): 61-65

- [13] DREAM – Community of Sant’Egidio *Long life to Africa: defeating AIDS and malnutrition* Leonardo International, 2008
- [14] Marazzi MC, Palombi L, Liotta G, Germano P, Abdul Majid N, Zimba I, Doro Altan A, Bortolot G, Nielsen-Saines K. *Decrease in HIV-1 Mother-to-Child transmission in women receiving postnatal HAART: 12-month follow-up data* 15th International Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Boston 2008 February 5-9” Abstract book n° 639
- [15] Germano P, Buonomo E, Guidotti G, Liotta G, Scarcella P, Mancinelli S, Palombi L, Marazzi MC *DREAM: an integrated public health programme to fight HIV/AIDS and malnutrition in limited-resource settings* WFP – Community of Sant’Egidio, Rome 2007
- [16] Koziel MJ, Peters MG. *Viral Hepatitis in HIV Infection*. N Engl J Med 2007; 356:1445-54.
- [17] Dianzani F, Ippolito G, Moroni M. *AIDS 1998. Il contributo italiano*. Padova 1998 Piccin Nuova Libreria.
- [18] Soriano V, Garcia-Samaniego J, Valencia E, Rodriguez-Rosado R, Munoz F, Gonzalez-Lahoz J. *Impact of chronic liver disease due to hepatitis viruses as cause of hospital admission and death in HIV-infected drug users*. Eur J Epidemiol 1999; 15: 1-4.
- [19] Ruth Nogueira Cordeiro Moraes Jardim, Neiva Sellan Lopes Gonçales, Josiane Silveira Felix Pereira et al. *Occult Hepatitis B in Virus Infection in Immunocompromised Patients*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2008; 12(4): 300-305.
- [20] Liang T.J., Baruch Y., Ben-Porath E., et al. *Hepatitis B virus infection in patients with idiopathic liver disease*. Hepatology 1991; 13: 1044-51.
- [21] Medrano F.J., Sanchez-Quijano A., Pineda J., Lissen E. *Isolated anti-HBc and hepatitis B virus occult infection*. Vox sang 1991; 61:140.

- [22] Sanchez-Quijano A., Jauregui J.I., Leal M., et al. *Hepatitis B virus occult infection in subjects with persistent isolated anti-HBc reactivity*. J Hepatol 1993; 17:288-93.
- [23] Villa E., Grottola A., Buttafuoco P., et al. *Evidence for Hepatitis B virus infection in patients with chronic Hepatitis C with and without serological markers of Hepatitis B*. Dig Dis Sci 1995; 40: 8-13.
- [24] Gonçales Junior F.L, Pereira J.S.F., Silva C., et al. *Hepatitis B virus DNA in sera of blood donors and of patients infected with Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus*. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10:1718-20
- [25] Pastore G., Santantonio T., Monno L., et al. *Effects of HIV superinfection on HBV replication in a chronic HBsAg carrier with liver disease*. J Hepatol 1998; 2:164-8.
- [26] Gilson R.J., Tedder R.S., Weller I.V. *Hepatitis B: reactivation or reinfection associated with HIV-1 infection*. Lancet ii:1330.
- [27] Hino K., Basumi A.A., Ireland J., et al. *Reappearance of Hepatitis B surface antigen in immunocompromised individuals: reinfection or reactivation?* Dig Dis Sci 2002; 47:415-8.

NHSRC CHECKLIST

To accompany proposals submitted to the committee for approval

Before submitting your study proposal to the Committee, complete the following checklist by ticking each item you have included. Do not send the proposal in unless you can tick all the boxes, or provide a reason for the absence of any item.

TITLE OF PROPOSAL:

The Evaluation of the HIV/HBV Co Infection among HIV Positive Patients in the DREAM(Drug Resources Enhancement Against AIDS and Malnutrition) Program in Malawi

PRINCIPAL INVESTIGATOR:

Prof. Leonardo Palombi, Prof of Epidemiology, University of Tor Vergata, Rome Italy. DREAM Program Scientific Director

The following are included in or with this proposal

1. Covering letter of introduction from the investigator []

20 copies of the study proposal formatted as recommended in the Procedures and guidelines. []
To include: -
Title []
Cover page []
Abstract []
Background and justification []
Literature review []
Hypothesis if any
Objectives []

Methodology
• type of study []
• place of study []
• Study period []
• Sample size []
• Data collection []
Dissemination of results []
Ethical considerations []
Personnel and Institution []
Work plan []
Budget []
Budget justification []
Bibliography []
2. Data collection instruments in both English & Chichewa or other appropriate Local language
sample are already available in the DREAM Laboratories []
3. Informed consent in both English and Chichewa (or appropriate language) []
4. Letter of approval from foreign ethics committee (for all students studying in foreign universities) []
The study is not for students hence this is not included
5. Application fee (U\$ 150)
6. Curriculum vitae (CVs) for all the investigators []
7. Approval certificate from the Pharmacy, Medicines and Poisons Board where the research involves products such as new pharmaceutical products []
The study will not involve any new pharmaceutical product

IF ANY ITEM IS NOT TICKED, EXPLAIN WHY THIS IS NOT INCLUDED WITH THE SUBMISSION

SIGNATURE:  NAME (PRINT) Lenardo Palombi DATE: **10th July 2009**

ALLEGATO 2

COPIE DEL CONSENSO INFORMATO PER L'ARRUOLAMENTO DELLE PAZIENTI DREAM NELLO STUDIO: IL DOCUMENTO È STATO RIPRODOTTO IN LINGUA INGLESE E CHICHEWA E PROPOSTO AI PAZIENTI IN BASE ALLA LINGUA DA LORO CONOSCIUTA.



NHRSC No.:

INFORMED CONSENT FORM
(Hepatitis B Study)

THE EVALUATION OF HIV/HBV CO INFECTIONS AMONG HIV POSITIVE PATIENTS IN THE DREAM (DRUG RESOURCES ENHANCEMENT AGAINST AIDS AND MALNUTRITION) PROGRAM IN MALAWI

Principal Investigator:
Prof. Leonardo Palombi, [Ph.D.] Prof. of Epidemiology, University of Tor Vergata – Rome.
DREAM program Scientific Director, Community of Sant'Egidio
Phone Number: 01751477

Local Principal Investigator

Richard Luhanga (MA) Master of Science in Biological Sciences, Chancellor College,
University of Malawi.
Biological Laboratory Technician, DREAM Centre Blantyre.
Phone Number: 01880330/0999345730

Co- investigators

Dr. Giuseppe Liotta PhD in Epidemiology and Micro Biology, University of Rome 'La Sapienza'
Researcher, Dept of Public Health, University of Tor Vergata – Rome. DREAM
program, Community of Sant'Egidio
Phone Number: 01751477/0888393227

Dr. Davide Brambilla PhD in Public Health, Dep. Of Public Health-Microbiology-Virology, section of
Virology, University of Milan, DREAM program Community of Sant'Egidio
Phone number: 0995695573

Dr. Susanna Ceffa PhD in Molecular and Experimental Oncology, University of Pisa, Italy. DREAM
program Community of Sant'Egidio

Mr Haswell Jere Diploma in Clinical Medicine, Malawi College of healthsciences DREAM program
Community of Sant'Egidio

What you should know about this research study:

- We give you this consent so that you may read about the purpose, risks, and benefits of this research study.
- Routine care is based upon the best known treatment and is provided with the main goal of helping the individual patient. The main goal of research studies is to gain knowledge that may help future patients.
- We cannot promise that this research will benefit you. Just like regular care, this research can have side effects that can be serious or minor.
- You have the right to refuse to take part, or agree to take part now and change your mind later.
- Whatever you decide, it will not affect your regular care.
- Please review this consent form carefully. Ask any questions before you make a decision.

- Your participation is voluntary.

PURPOSE

You are being asked to participate in a research study called The Evaluation of HIV/HBV Co-Infections among HIV Positive Patients in the DREAM (Drug Resources Enhancement Against AIDS and Malnutrition) Program in Malawi. The purpose of the study is to evaluate the HBV infection prevalence and the related clinical and Therapeutic impact in HIV positive patients receiving HAART at the DREAM Centres in Malawi. The study will also examine HBV infection prevalence in the group of immune-compromised DREAM Patient who will present "anti-HBc alone serological pattern. The information collected in this study will be useful to correlate the prevalence of HBV DNA, viral loads ,CD4 levels and previous lamivudine administration in order to improve intervention strategies. You were selected as a possible participant in this study because you are HIV/AIDS positive, female, receiving HAART at DREAM Centre and blood samples that were corrected from you are still stored and available at the DREAM Laboratory. We expect that 999 women will be participating in this study here in Malawi.

PROCEDURES AND DURATION

If you decide to participate, your clinical file kept at the DREAM Centre will analysed. The blood samples that were already collected from your body and stored at the DREAM laboratory will be analysed. You will not be required to give new blood samples for this purpose. The study is expected to last within 3months.

RISKS AND DISCOMFORTS

Unlike other studies where there is possible risk, this particular study has no risks as it is just analysis and evaluation of already stored data and blood samples.

BENEFITS AND/OR COMPENSATION

We cannot and do not guarantee or promise that you will receive any benefits from this study. You will of course continue receiving free treatment, free medications and standard Care just like any other person in our program.whether or not s/he is participating in this research study.

CONFIDENTIALITY

If you indicate your willingness to participate in this study by signing this document, we plan to disclose the results of this study to the National Sciences research Committee and the Ministry of Health. Whereas the results will be disclosed you will not be identified in any of the reports. This results will be disclosed in order to make sure that the results of this study are used to improve the treatment of people living with HIV/AIDS. Please take note that any information that is obtained in connection with this study that can be identified with you will remain confidential and will be disclosed only with your permission. *Authorized representatives of the Medicines Control Authority will have access to your medical records for purposes of inspection.* Under some circumstances, the NHSRC may need to review patient records for compliance audits.

IN THE EVENT OF ADVERSE EFFECT

Financial compensation is not available.
In the event of Adverse effects, contact: 01751477

VOLUNTARY PARTICIPATION

Participation in this study is voluntary. If you decide not to participate in this study, your decision will not affect your future relations with the Community of Sant' Egidio, its personnel, and associated hospitals. If you decide to participate, you are free to withdraw your consent and to discontinue participation at any time without penalty.

Your refusal or acceptance to participate in this study will not affect your access to medication or any other services provided by the Community of Sant' Egidio or any other hospitals or clinics.

OFFER TO ANSWER QUESTIONS

Before you sign this form, please ask any questions on any aspect of this study that is unclear to you. You may take as much time as necessary to think it over.

AUTHORIZATION

You are making a decision whether or not to participate in this study. Your signature indicates that you have read and understood the information provided above, have had all your questions answered, and have decided to participate.

The date you sign this document to enroll in this study, that is, today’s date, MUST fall between the dates indicated on the approval stamp affixed to each page. These dates indicate that this form is valid when you enroll in the study but do not reflect how long you may participate in the study. Each page of this Informed Consent Form is stamped to indicate the form’s validity as approved by the NHSRC.

INFORMED CONSENT

I declare that I have voluntarily accepted to participate to the study,that I have received sufficient explanations about my participation to the study; I declare that I have understood the information I have been given about the study. I had an opportunity to ask questions and to receive answers. I have been informed that I can withdraw from the study at any time without any change in my medical care and that the collected data will be utilised for the objective of the study.For any information I can ask any of the Doctors involved in this assessment.

Date

Time AM/PM

Name of Research Participant (please print):

Signature of Participant or legally authorized representative

Relationship to the Participant
[this line should not appear on forms that will be given to participants consenting for themselves.]

Signature of Witness:

Signature of Staff Obtaining Consent

YOU WILL BE GIVEN A COPY OF THIS CONSENT FORM TO KEEP.

If you have any questions concerning this study or consent form beyond those answered by the investigator, including questions about the research, your rights as a research subject or research-related injuries; or if you feel that you have been treated unfairly and would like to talk to someone other than a member of the research team, please feel free to contact the National Research Council of Malawi on telephone 01771550 or the Ministry of Health 01789400

NHRSC No.:

INFORMED CONSENT FORM
(Hepatitis B Study)

**THE EVALUATION OF HIV/HBV CO INFECTIONS AMONG HIV POSITIVE PATIENTS IN THE
DREAM (DRUG RESOURCES ENHANCEMENT AGAINST AIDS AND MALNUTRITION) PROGRAM IN
MALAWI**

Principal Investigator:

Prof. Leonardo Palombi, [Ph.D.] Prof. of Epidemiology, University of Tor Vergata – Rome.

DREAM program Scientific Director, Community of Sant'Egidio

Phone Number: 01751477

Local Principal Investigator

Richard Luhanga (MA) Master of Science in Biological Sciences, Chancellor College,
University of Malawi.

Biological Laboratory Technician, DREAM Centre Blantyre.

Phone Number: 01880330/0999345730

Co- investigators

Dr. Giuseppe Liotta PhD in Epidemiology and Micro Biology, University of Rome 'La Sapienza'
Researcher, Dept of Public Health, University of Tor Vergata – Rome. DREAM
program, Community of Sant'Egidio

Phone Number: 01751477/0888393227

Dr. Davide Brambilla PhD in Public Health, Dep. Of Public Health-Microbiology-Virology, section of
Virology, University of Milan, DREAM program Community of Sant'Egidio

Phone number: 0995695573

Dr. Susanna Ceffa PhD in Molecular and Experimental Oncology, University of Pisa, Italy. DREAM
program Community of Sant'Egidio

Mr Haswell Jere Diploma in Clinical Medicine, Malawi College of healthsciences DREAM program
Community of Sant'Egidio

ZIMENE MUYENERA KUDZIWA ZA KAFUKUFUKU AMENEYU

- Tikukupatsani fomu iyi kuti muyiwerenge ndikudziwa zolinga zake, zowoopsya ndizotsatira zakafukufukuyu
- Kasamalidwe ka ndondomeko kali kuchokera pa ubwino wodziwika wachithandizo ndi kaperekedwe ka zikuluzikulu zotsatira pamene tili kuthandiza wodwalayo payekha, cholinga chachikulu cha kafukufukuyu ndichoti tipeze nzeru zabwino zoti zitha kudzathandiza wodwala ena mtsogolo muno.
- Sitingakulonjezeni kuti kafukufukuyu angadzakupindulireni monga mwachisamalilo chachizolowezi kafukufukuyu akhoza kukhala ndi zoyipa zake monga zazikulu ndi zazing'ono zomwe.
- Muli ndi ufulu wokana kutengapo mbali kapenaso kuvomereza kutengapo mbali pakali pano ndikudzasintha maganizo anu patsogolo
- Fundo imene mwasankha sidzakhala yoyipa pa chisamalidwe cha chizolowezi chanu.
- Chonde yesetsani kuwerenganso bwinobwino fomuyi mosamala, funsani mafunso musanapange maganizo anu.
- Kutengapo mbali pakafukufuku ndikufuna kwanu panokha osati mowumiliza.

CHOLINGA CHAKAFUKUFUKUYU

Muli wocephedwa kutengapo mbali pa kafukufuku wochedwa The Evaluation of HIV/HBV coinfections among the HIV positive Patients in the DREAM (Drug Resources Enhancement Against AIDS and Malnutrition) Program in Malawi .Cholinga cha kafufukuyu ndi kuwunika za kuchuluka kwa anthu amene ali ndi Kachilombo ka HIV amene angapezeke ndi kachilombo ka HBV komanso kuti kachilombo kameneka ka HBV kakukhuzana bwanji ndi mankhwala a mundondomeko ya HAART amene anthu ali ndi kachilombo ka HIV akumalandira ku ma DREAM Centres.

Kafukufukuyu adzawunikanso kuchuluka kwa anthu amene chitetezo cha nthupi chawo chili chochepa amene akupezeka nthupi mwawo ndi mankhwala olimbana ndi HBc (anti HBc) Zonse zimene zizatoledwe pakafukufukuyu zidzakhala zofunika kwambiri makamaka pofuna kudziwa ngati pali kukhuzana kuli konse pakapezedwe nthupi ka HBV DNA, Kachulukidwe ka tidzilombo nthupi (Viral load), kachulukidwe ka chitetezo nthupi(CD4 levels) komanso mankhala a lamivudine amene mwakhala mukumwa. Cholinga cha izi ndikufuna kukometsera njira zothana ndi matendawa.

Inu mwatsankhidwa ngati mmodzi angathe kutengapo gawo mkafukufukuyu chifukwa muli ndi kachilombo koyambitsa AIDS ka HIV, ndinu wamkazi,mumalandira mankhwala mundondomeka ya HAART ku DREAM Centre komanso magazi anu omwe munatengetsa mbuyomu adakalipobe ku Laboratory ya DREAM.Tili ndi Chiyembekezo choti azimayi okwana 999 adzatengapo mbali pa kafukufuku ameneyu

NDONDOMEKO NDI NTHAWI YAKAFUKUFUKU

Ngati mwasankha kutengapo mbali pa kafukufukuyu, failo yanu ya chipatala imene ili ku DREAM Centre tidzaunikanso. Magazi amene munatengetsa kale amene amasungidwa ku Laboartore ya DREAM adzaunikidwanso. Simuzayenera kuperekanso magazi ena mukafukufukuyu. Tikuyembekeza kuti kafukufukuyu atenga miyezi yosaposeera itatu

ZOVUTA NDI ZOSOWETSA MTENDERE PA KAFUKUFUKUYU

Pamene makafukufuku ena amakhala ndi zovuta ndi zosowetsa mtendere, kafukufuku uyu alibe zimezi chifukwa tigwiritsa ntchito mafailo ndi magazi oti alipo kale.

PHINDU KAPENA CHIPEPESO CHOMWE CHINGAKHALEPO

Sitili wokulonjezani kapena kukutsimikizani kuti mudzalandira phindu kuchokela pa kukafukufukuyu. Mupitiliza kulandira chithandizo cha ulele, mankhwalanso aulere ndi chisamalilo choyenera ngati munthu wodwala ali yense amene ali mpologalamu yathuyi ngakhale asali kutengapo mbali kapenaso ayi.

KATETEZEDWE KA CHINSINSI CHANU

Ngati mwawonetsa chidwi choti mutengapo mbali pa kafukufuku ameneyo mudzayenera kusayinira fomuyi. Tili wozekka kudzawulutsa zotsatila za kafukufukuyu ku bungwe la National Sciences Reserch Committee pamene zotsatirazi zidzakhale zikutuluka simungazindikire kapenaso kutchulidwa mu ripoti lathuli zotsatirazi zidzaulutsidwa malingana mnkuti zotsatilazi zidzakhala ndi kutukula chithandizo kwa anthu amene ali mkukhala ndi kachilombo ka HIV/AIDS Chonde muyenera kudziwa kuti zotsatira zimene zidzapezeke zidzayenera kutengedwa molingangana ndikafukufukuyu ndipo zizayenera zipezeke kwa inu ndipo zikhoza kudzauluka mwa chifuniro chanu. Nthumwi zoyimira bungwe la Medicines Control Authority zidzayenera kukhala ndimpata ku zotsatira zanu za chithandizo chanu kuti adzagwire bwino ntchito ya kuwunika ka kafukufukuyu. Padzifukwa zina bungwe la NHSRC akhoza kudzafunsa zotsatira kuti adzathe kupanga mayeso oona ngati kafukufukuyu wayenda bwino ndi motsata ndondomeko yake.

NANGA TITAZINDIKIRA ZOVUTA ZINA PA NTHAWI YA KAFUKUFUKU

- Palibe kupatsidwa chipepeso cha ndalama
- Ngati mwapeza vuto lilironse uzani a pa foni iyi **01751477**

KUTENGAPO MBALI MWAULELE

Kutengapo mbali pa kafukufukuyu ndikofuna kwanokha wosati mowumirizidwa ngati mwasankha kuti musatengapo mbali mu kafukufukuyu, maganizo anu sadzakhudza ubale watsogolo lanu pakati pa inu ndi Komunite ya Sant Egidio ndimagano anu amenewo ndi mgwirizano wa zipatala. Ngati mwaganiza kuti mutengapo mbali muli a ufulu kuloledwa kudzasiya fomuyi ndi kusiya kutengapo mbali nthawi yiriyonse wopanda chilango chilichonse.

Kusatengapo mbali kapenanso kutengapo mbali pa kafukufukuyu sikudzakhala ndi chiletso chirichonse choti mukhoza kupeza mankhwala kapenanso chithandizo chilichonse chimene a Komunite ya Santi Egidio amaperereka kapenanso chipatala chilichonse

KUPATSIDWA MPATA WOYANKHA MAFUNSO

Musanasayinile fomuyi chonde funsani mafunso wokhudzana ndi cholinga cha kafukufukuyu chimene simukumvetsa. Muli ndi nthawi yambiri kobasi kuti muganizire za zimenezi.

KUPATSIDWA MPATA WOYANKHA MAFUNSO

Musanasayinile fomuyi chonde funsani mafunso wokhudzana ndi cholinga cha kafukufukuyu chimene simukumvetsa. Muli ndi nthawi yambiri kobasi kuti muganizire za zimenezi.

CHIVOMEREZO CHA OTENGA NAWO MBALI.

Ndikuvomeleza kuti nditengapo gawo pa kafukufukuyu kaamba koti ndafotokozeledwa bwino zakufunika kwanga m'kafukufukuyu. Ndikutsimikiza kuti ndamvetsa zonse ndipo ndinapatsidwa mwayi wofunsa ndi kuyakhidwa mafunso.

Ndafotokozeledwanso kuti nditha kulekera panjira kafukufukuyu nthawi iliyonse popanda kusintha kwa mtundu uli wonse pachithandizo cha mankhwala womwe ndimalandila ndiponso kuti zonse zomwe zatoleledwa zidzagwiritsidwa ntchito pazolinga zenizeni zakafukufukuyu.

Ngati pangakhale mafunso ena kapena chilichonse ndinkoza kufunsa madokotala amene ali mukafukufuku ameneyu.

**Saini ya otenga nawo mbali
Chizindikiro chodinda ndi chala**

Tsiku

Dzina la otenga mbali

Saini ya otenga Chilolezo

Tsiku

Dzina la otenga chilolezo

**Otenga nawo mbali? wosadziwa kulemba Olemba ndi kuwerenga
Ndi kuwerenga**

Saini ya mboni

Tsiku

Dzina la mboni

7. Bibliografia

[1] <http://www.WHO.int>

[2] Zuckerman A.J. More than third of world's population has been infected with hepatitis B virus. BMJ 1999; 318: 1213.

[3] Alter M.J. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B. Seminars in Liver Disease 2003; Vol. 23, Num. 1: 39-46.

[4] Kao J-H. Chen D-S. Global control of hepatitis B virus infection. Lanc. Inf. Dis. 2002; 2: 395-403.

[5] CDC.Hepatitis section <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/hepatitis.htm>

[6] Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M. Virus-like particle in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis B. Lancet 1970; 2: 695.

[7] Kann M, Gerlich W.H. Hepatitis B. In: "Microbiology and microbial infections. Virology". B.W.J Mahy, L. Collier. Eds. Arnold, London 1998, 745-775.

[8] Lee W.M. Hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1997; Vol. 337, N. 24 :1733-1745.

[9] Summers J., Mason W.S. Replication of the genome of a hepatitis-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1990; 29: 403-15.

[10] Tiollais P., Wain-Hobson S. Molecular genetics of hepatitis B virus. In: F.V. Chiari ed. *Advance in Hepatitis research.* New York, Masson Publ 1984; 9.

[11] Heermann K.H., Kruse F., Seifer M., et al. Immunogenicity of the S and pre-S domains in hepatitis B virions and HBsAg filaments. *Intervirology* 1987; 28: 14.

[12] Wallace L.A., Carman W.F. Surface Gene Variation of HBV: Scientific and Medical Relevance. *Vir. Hepat. Rev.* 1997; Vol.3, Num.1: 5-16.

[13] Bruss V., Gerlich W.H. Formation of transmembranous Hepatitis B e antigen by cotraslation in vitro processing of the viral precore protein. *Virology* 1988; 163: 268-275.

[14] Bruss V., Heermann K.H., Gerlich W.H. Role of the pre-core protein and HBe antigen in maturation and secretion of human hepatitis B virus. *Liss: Hepatitis Viruses,* Mason W. and Will H. New York 1987.

[15] Uy A., Bruss V., Gerlich W.H. et al. Precore sequence of hepatitis B virus inducing e antigen and membrane association of the Viral Core protein. *Virology* 1986; 155: 89-96.

[16] Colgrove R., Simon G., Ganem D. Transcriptional activation of homologous and eterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication. *J. Virol.* 1988; 63: 4019-4026.

[17] Yen T.S.B. Hepadnaviral X protein: review of recent progress. *J. Biomed. Sci.* 1996; 3: 20-30.

- [18] Kidd-Ljunggren K., Miyakawa Y., Kidd A.H. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J. Gen. Vir.* 2002; 83: 1267-1280.
- [19] Stuyver L., De Gendt S., Van Geyt C. et al., A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Vir.* 2000; 81:67-74.
- [20] Fattovich G. Natural History and Prognosis of Hepatitis B. *Seminars in Liver Disease* 2003; Vol. 23; Num. 1: 47-58.
- [21] Beasley R.P. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988; 61: 1942-1956.
- [22] McMahon B.J., Alward W.L.M., Hall D.B., et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J. Infect. Dis.* 1985; 151: 599-603.
- [23] Chang M.H. Natural history of Hepatitis B infection in children. *J. Gastr. Hepat.* 2000; 15 (Supl.): E11-E19.
- [24] Carman W.F., Jacyna M.R., Hadziyannis S., et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2: 588-591.
- [25] De Lalla F., Caredda F. Infezioni del fegato e delle vie biliari. In: "Malattie infettive". Moroni M., Esposito R., De Lalla F. Ed. Masson, Milano 2003, 523-560.
- [26] Jung M.C., Pape G.R. Immunology of hepatitis B infection. *Lanc. Infect. Dis.* 2002; 2: 43-50.
- [27] Lok A.S., McMahon B.J. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 1225-1241.

[28] Colgrove R., Simon G., Ganem D. Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication. *J. Virol.* 1988; 63: 4019-26.

[29] Hoofnagle J. Therapy of acute and chronic hepatitis B. *Adv. Intern. Med.* 1994; 39: 241-275.

[30] Wong D.K., Cheung A.M., O'Rourke K, et al. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 1993; 119: 312-323.

[31] Bartholomeusz A., Locarnini S. Mutations in the hepatitis B virus polymerase gene that are associated with resistance to famciclovir and lamivudine. *Int. Antiviral. News* 1997; 5: 123-124.

[32] Pichoud C., Seignères B., Wang Z. et al. Transient Selection of a Hepatitis B Virus Polymerase Gene Mutant Associated With a Decreased Replication Capacity and Famciclovir Resistance. *Hepatology* 1999; 29: 230-237.

[33] F. Dianzani, G. Ippolito, M. Moroni. *AIDS 1998. Il contributo italiano.* Padova 1998 Pccin Nuova Libreria.

[34] Alberti A, Chemello L, Benvegnù L. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31 (suppl 1): 17-24.

[35] Soriano V, García-Samaniego J, Valencia E, Rodríguez-Rosado R, Muñoz F, González-Lahoz J. Impact of chronic liver disease due to hepatitis viruses as cause of hospital admission and death in HIV-infected drug users. *Eur J Epidemiol* 1999; 15: 1-4.

[36] Puoti M, Zanini B, Patroni A et al. End stage liver disease is becoming the leading cause of death in HIV seropositives : association between hepatitis viruses coinfections,

antiretrovirals hepatotoxicity and risk of death in a large prospective cohort study. *Dig Liv Dis* 2001 ; 33 : 100.

[37] Sulkowski M, Thomas DL, Chaisson RE and Moore RD. : Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy in adults infected with human immunodeficiency virus and the role of hepatitis C or B virus infection . *JAMA* 2000: 74-80.

[38] Martinez E, Blanco JL, Arnaiz JA, Perez-Cuevas JB et al : Hepatotoxicity in HIV-1-infected patients receiving nevirapine-containing antiretroviral therapy . *AIDS* 2001 ; 15 : 1261-1268.

[39] Nunez M, Lana R, Mendoza JL, Martin-Carbonero L, and Soriano V. Risk factors for severe hepatic injury after introduction of highly active antiretroviral therapy. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* ; 27 :426-431.

[40] Bonfanti P, Valsecchi L Parazzini F et al : Incidence of adverse reactions in HIV patients treated with protease inhibitors : a cohort study . *JAIDS* 2000; 23: 236-45.

[41] D'Arminio A, Bugarini P, Pezzotti P et al. Low Frequency of Severe Hepatotoxicity and Association With HCV Coinfection in HIV-Positive Patients Treated With HAART. *JAIDS* 2001;28:114-123.

[42] Bonfanti P, Landonio S, Ricci E et al. : Risk factors for hepatotoxicity in patients treated with highly active antiretroviral therapy . *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2001 ; 27 : 316-318.

[43] Saves M, Vandentorren S, Daucourt V et al : Severe hepatic cytolysis : incidence and risk factors in patients treated by antiretroviral combinations Aquitaine Cohort , France,1996 –1998 . *AIDS* 1999 F115-121.

[44] Saves M., Raffi F, Clevenbergh P et al. :Hepatitis B or hepatitis C virus infection is a risk factor for severe hepatic cytolysis after initiation of a protease inhibitor-containing antiretroviral regimen in human immunodeficiency virus-infected patients . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , Dec.2000 , p. 3451-3455.

[45] Wit FW, Weverling GJ, Weel J, Jurriaans S, Lange JM.; Incidence of and risk factors for severe hepatotoxicity associated with antiretroviral combination therapy.*J Infect Dis.* 2002 Jul 1;186(1):23-31.

[46] Puoti M, Airoidi M, Bruno R, et al. Hepatitis B Virus coinfection in HIV seropositives *AIDS Reviews* 2002.

[47] Wong DKH, Cheung AM, O'Rourke K, Naylor CD, Detsky AS, Heathcote J.Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1993, 119:312-23.

[48] Wong DKH, Colina Y, Naylor DC et al. Interferon alfa treatment for chronic hepatitis B: randomised trial in a predominantly homosexual male population. *Gastroenterology* 1995;108:165-71.

[49] Pol S, Jiang JJ, Driss F et al. Efficacy of alpha interferon in chronic active hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1992;16:S20 .

[50] Thibault V, Benhamou Y, Seguret C et al. Hepatitis B virus mutations associated with resistance to lamivudine in patients coinfecting with HBV and human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1999;37(9):3013-16.

- [51] Benhamou Y, Bochet M, Thibault V et al. Safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients co-infected with HIV-1 and lamivudine resistant hepatitis B virus: an open label pilot study. *Lancet* 2001;358:718-23.
- [52] Bruno R, Sacchi P, Malfitano A and Filice G. YMDD-mutant HBV strain as a cause of liver failure in an HIV-infected patient. *Gastroenterology*. 2001 Oct;121(4):1027-8.
- [53] Brechot C et al. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1985;312:270–76.
- [54] Chemin I, Trepo C. Clinical impact of occult HBV infections. *J Clin Virol* 2005; 34: S15-21.
- [55] Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2006; 44: 675-84.
- [56] Raimondo G, Balsamo C, Craxì A, Farinati F, Levrero M, Mondelli M, Pollicino T, Squadrito G, Tiribelli C. Occult hepatitis B virus infection. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 822-6.
- [57] Chou YC, Cheu ML, Hu CP, Chen YL, Chong CL, Tsai YL, Liu TL, Jeng KS, Chang C. Transforming growth factor-beta 1 suppresses hepatitis B virus replication primarily through transcriptional inhibition of pregenomic RNA. *Hepatology* 2007; 46: 672-81.
- [58] Schuttler CG, Fiedler N, Schmidt K, Reep R, Gerlich WH, Schaefer S. Suppression of hepatitis B virus enhancer 1 and 2 by hepatitis C virus core protein. *J Hepatol* 2002; 37: 855-62.
- [59] Torbenson M, Thomas D Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 479-86.
- [60] Gunther S et al. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv. Virus Res* 1999; 52: 25-137.

- [61] Liang TJ et al. Characterization and biological properties of hepatitis B virus from a patient without hepatitis B virus serologic markers. *Hepatology* 1990;12:204-12.
- [62] Chaudhuri V et al. Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology* 2004; 127:1356-71.
- [63] Rodriguez-Torres M, Gonzalez-Garcia J, Brau N, Sola R, Moreno S, Rockstroh J, Smaill F, Mendes-Correa MC, Depamphilis J, Torriani FJ. Occult hepatitis B virus infection in the setting of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) co-infection: Clinically relevant or a diagnostic problem? *J Med Virol* 2007; 79: 694-700
- [64] Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2007; 46: 160-70.
- [65] Yotsuyanagi H et al. Virologic analysis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan: frequent involvement of hepatitis B virus. *J Infect Dis* 2000;181:1920–28.
- [66] Pollicino T et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology* 2004; 126: 102-10.
- [67] Matsumoto C et al. Detection and quantitation of HBV DNA by semi-nested PCR in donated blood: comparison with HBV serological markers. *J Virol Meth* 1997; 66:61–69.
- [68] Iizuka H et al. Correlation between anti-HBc titers and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg. *Vox Sang* 1992;63:107–11.
- [69]. Weinberger KM et al. High genetic variability of the group-specific a- determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J Gen Virol*, 2000; 81:1165–74.

[70] Brechot C, Thiers V, Kremdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult". *Hepatology* 2001; 34: 194-203.

[71] Larghi A, Leffler D, Frucht H, Rubin M, Semrad CE, Lefkowitz JH, Worman HJ. Hepatitis B virus reactivation after kidney transplantation and new onset lymphoma. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 276-80.

[72] Squadrito G, Pollicino T, Cacciola I, Caccamo G, Villari D, La Masa T, Restuccia T, Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando A, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *NEJM* 1999; 341: 22-26

[73] Cucinotta E, Scisca C, Magazzu D, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients. *Cancer* 2006; 106: 1326-30

[74] Chemin I, Trepo C. Clinical impact of occult HBV infections. *J Clin Virol* 2005; 34: S15-21

[75] Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology* 2004; 127: S56-61

[76] Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Cacciola I, Raffa G, Craxì A, Farinati F, Missale G, Smedile A, Tiribelli C, Ville E, Raimondo G. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology* 2004; 126: 102-10

[77] Donato F, Gelatti U, Limina RM, Fattovich G. Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Oncogene* 2006; 25: 3756-70

[78] Miura Y, Shibuya A, Adachi S, Takeuchi A, Tsuchihashi T, Nakazawa T, Saigenji K. Occult hepatitis B virus infection as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C in whom eradication fails. *Hepatol Res* 2008 Jan 2 [Epub ahead of print]

- [79] Pollicino T, Raffa G, Costantino L, Lisa A, Campello C, Squadrito G, Levrero M, Raimondo G. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007; 45: 277-85
- [80] Trattato di medicina interna-G. Crepaldi-A. Baritussio. ISBN 88-299-1642-0, edizioni Piccin 2003
- [81] Dibisceglie AM, Kew MC, Dusheiko GM, et al. Prevalence of hepatitis B virus infection among black children in Soweto. *BMJ*. 1986;292:1440-1442. [Abstract](#)
- [82] Burnett RJ, Francois G, Kew MC, et al. Hepatitis B virus and human immunodeficiency virus coinfection in sub-Saharan Africa: a call for further investigation. *Liver Int.* 2005;25:201-213. [Abstract](#)
- [83] Thio C. Hepatitis B virus infection in HIV-infected persons. *Curr Hepatitis Rep.* 2004;3:91-97.
- [84] www.unaids.org/en/regionscountries/countries/malawi/
- [85] Ahmed SD, Cuevas LE, Brabin BJ, Kazembe P, Broadhead R, Verhoeff FH, Hart CA. 1998. Seroprevalence of hepatitis B and C and HIV in Malawian pregnant women. *J Infect Dis.* 177:248-251
- [86] Candotti D, Mundy C, Kadewele G, Nkhoma W, Bates I, Allain JP. Serological and Molecular Screening for Viruses in Blood Donors From Ntcheu, Malawi: High Prevalence of HIV-1 Subtype C and of Markers of Hepatitis B and C Viruses. *J. Med. Virol.* 65:1-5,2001.
- [87] Sugauchi F, Orito E, Kato H et al. Genotype, Serotype and Phylogenetic Characterization of the Complete Genome Sequence of Hepatitis B Virus Isolates From Malawian Chronic Carriers of the Virus. *J. Med. Virol.* 69:33-40,2003.
- [88] Kramvis A, Kew M, Francois G. Hepatitis B Genotypes. *Vaccine* 23 (2005) 2409-2423.

- [89] Nyerenda M, Beadsworth MBJ, Stephany P, Hart CA et al. Prevalence of infection with hepatitis B and C virus and coinfection with HIV in medical inpatients in Malawi. *J. Inf* (2008) 57, 72-77.
- [90] Moore E, Beadsworth MBJ, Chaponda M, Mhango B et al. Favourable one-year ART outcomes in adult Malawians with hepatitis B and C co-infection. *J. Inf* (2010) xx, 1-9.
- [91] Liotta G, Buonomo E, Creton G, Emberti Gialloreti L, Magnano M, Marazzi MC. A home care program for people living with AIDS in Mozambique. XII Int. Conf. on AIDS and STDs in Africa. Ouagadougou, 9-13 Dec 2001; Abstract book p.21.
- [92] Emberti Gialloreti L, Palombi L, Guidotti G, Buonomo E, Nathave I, Liotta G, Marazzi MC. Pilot program for prevention and treatment of AIDS in Mozambique. XII Int. Conf. on AIDS and STDs in Africa. Ouagadougou, 9-1 Dec. 2001; Abstract book p.59.
- [93] WHO. Scaling up antiretroviral therapy in limited-resource settings. Guidelines for a public health approach. Geneva 2002.
- [94] Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA* 1993; 269:729-30.
- [95] Yeni PG, Hammer SM, Carpenter CC, Cooper DA, et al. Antiretroviral treatment for adult HIV infection in 2002: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 2002; 288: 222-35.
- [96] Holmes CB, Losina E, Walensky RP, Yazdanpanah Y, Freedberg KA. Review of human immunodeficiency virus type 1-related opportunistic infections in sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis* 2003;36:652-62.
- [97] Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997; 126:946-954.
- [98] Hogg RS, Yip B, Kully C, et al. Improved survival in HIV-infected patients after initiation of triple-drug antiretroviral regimens. *CMAJ* 1999; 160:659-65.

- [99] Montaner JS, Reiss P, Cooper D, et al. A randomized double-blind trial comparing combination of nevirapine, didanosine and zidovudine in HIV-infected patients: the INCAS study. Italy, The Netherlands, Canada and Australia Study. JAMA 1998; 279:930-7.
- [100] Stazweski S, Kaiser P, Montaner J, et al. Abacavir-lamivudine-zidovudine vs indinavir-lamivudine-zidovudine in antiretroviral naïve HIV-infected adults: a randomized equivalent trial. JAMA 2001; 285:1155-63.
- [101] Stazweski S, Morales-Ramirez J, Tashima KT, et al. Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV infection in adults. Study 006 Team. N Engl J Med 1999; 341:1865-73.
- [102] Casado JL, Dronda F, Hertogs K, et al. Efficacy, tolerance and pharmacokinetics of the combination of stavudine, nevirapine, nelfinavir and saquinavir as salvage regimen after ritonavir or indinavir failure. AIDS Res Hum Retroviruses 2001; 17:93-98.
- [103] Van der Valk M, Kastelein JJ, Murphy RL, et al. Nevirapine-containing antiretroviral therapy in HIV-1 infected patients results in an antiatherogenic lipid profile. AIDS 2001; 15:2407-14.
- [104] Bartlett JA, De Masi R, Quinn J, Moxham C, Rousseau F. Overview of the effectiveness of triple combination therapy in antiretroviral naïve HIV-1 infected adults. AIDS 2002; 16:1190-95.
- [105] Food and Drug Administration approved a new, extended release formulation of ZERIT. Available on www.aidsinfo.nih.gov
- [106] Sarner L, Fakoya A. Acute onset lactic acidosis and pancreatitis in the third trimester of pregnancy in HIV-1 positive women taking antiretroviral medication. Sex Transm Infect 2002; 78:58-9.
- [107] Havlir DV, Barnes PF. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med 1999; 340:367-373.

- [108] De Simone JA, Pomerantz RJ, Babinchak TJ. Inflammatory reactions in HIV-1-infected persons after initiation of highly active antiretroviral therapy. *Ann Intern Med* 2000; 133:477-454.
- [109] Peloquin C. Therapeutic implications of drug interactions in the treatment of human immunodeficiency virus-related tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1999; 28:419-429.
- [110] Kebba A, Atwine D, Mwebaze R, Kityo C, Nakityo R, Peter M. Therapeutic responses to AZT + 3TC + EFV in advanced antiretroviral naïve HIV type 1-infected Ugandan patients *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18: 1181-7.
- [111] De Truchis P, Force G, Welker Y, et al. Efficacy and safety of a quadruple combination Combivir + abacavir + efavirenz regimen in antiretroviral treatment-naïve HIV-1-infected adults: La Francilienne. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 31:178-82.
- [112] Emberti Gialloreti L, De Luca A, Perno CF, et al. Increase in survival in HIV-1 infected subjects in Matola, Mozambique, after the introduction of Combination therapy with mgeneric manufactured Antiretrovirals: preliminary results from the DREAM cohort. Abstracts of 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections. Boston, February 10- 14, 2003, p122.
- [113] Mock PA, Shaffer N, Bhadrakom C, et al. Maternal viral load and timing of mother-to-child- transmission, Bangkok, Thailand. Bangkok Collaborative Perinatal HIV transmission Study Group. *AIDS* 1999; 13:407-14.
- [114] Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, et al. Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. *N Engl J Med* 1999; 341:394-402.
- [115] Mofenson LM. Interaction between timing of perinatal Human Immunodeficiency virus infection and the design of preventive and therapeutic interventions. *Acta Paediatr Suppl* 1997; 421:1-9.
- [116] Hart CE, Lennox JL, Pratt-Palmore M. Correlation of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in blood and the female genital tract. *J Infect Dis* 1999; 179:871-2.

- [117] Mofenson LM, Lambert JS, Stiehm ER, et al. Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. *N Engl J Med*. 1999; 341:385-393.
- [118] Fawzi WW, Msamanga GI, Spiegelman D, et al. Randomised trial of effects of vitamin supplements on pregnancy outcome and T cell counts in HIV-1-infected women in Tanzania. *Lancet* 1998; 351:1477-82.
- [119] Luzzati R, Del Bravo P, Di Perri G, Luzzani A, Concia E. Riboflavine and severe lactic acidosis. *Lancet* 1999; 353:901-2.
- [120] Blanche S, Tardieu M, Rustin P, et al. Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet* 1999; 354:1084-9.
- [121] Lipshultz SE, Easley KA, Orav EJ, et al. Absence of cardiac toxicity of zidovudine in infants. Pediatric Pulmonary and Cardiac Complications of Vertically Transmitted HIV Infection Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343:759-66.
- [122] Bulterys M, Nesheim S, Abrams EJ, et al. Lack of evidence of mitochondrial dysfunction in the offspring of HIV-infected women. Retrospective review of perinatal exposure to antiretroviral drugs in the perinatal AIDS collaborative Transmission Study. *Ann NY Acad Sci* 2000; 918:212-21.
- [123] Committee APRS. Antiretroviral Pregnancy Registry International Interim Report for 1 January 1989 through 31 July 2002. Wilmington NC: Registry Project Office.
- [124] Hellerstein MK, Wu K, McGrath M, et al. Effects of dietary n-3 fatty acid supplementation in men with weight loss associated with the acquired immune deficiency syndrome: Relation to indices of cytokine production. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 11:258-70.
- [125] Shabert JK, Winslow C, Lacey JM, Wilmore DW. Glutamine-antioxidant supplementation increases body cell mass in AIDS patients with weight loss: a randomized, double-blind controlled trial. *Nutrition* 1999; 15:860-4.

- [126] Fawzi WW, Mbise RL, Hertzmark E, Fataki MR, Herrera MG, Ndossi G, Spiegelman D. A randomized trial of vitamin A supplements in relation to mortality among human immunodeficiency virus-infected and uninfected children in Tanzania. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:127-33.
- [127] Fawzi WW, Msamanga GI, Spiegelman D, Urassa EJ, Hunter DJ. Rationale and design of the Tanzania Vitamin and HIV Infection Trial. *Control Clin Trials* 1999; 20:75-90.
- [128] Comunità di Sant'Egidio. *Curare l'AIDS in Africa*. Roma, Leonardo International Editore, Milano, Dicembre 2003.
- [129] World Health Organization: *Global programme on AIDS, Manual for national AIDS control programs*, August 1989.
- [130] Sherman GG, Galpin JS, Patel JM, Mendelow BV, Glencross DK. CD4+ T cell enumeration in HIV infection with limited resources. *J Immunol Methods* 1999; 222: 209-17.
- [131] Diagbouga S, Durand G, Sanou PT, Dahourou H, Ledru E. Evaluation of a quantitative determination of CD4+ and CD8 molecules as an alternative to CD4+ and CD8+ T lymphocyte counts in Africans. *Trop Med Int Health* 1999; 4:79-84.
- [132] Jani IV, Janossy G, Brown DW, Mandy F. Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resource-poor settings. *Lancet Infect Dis* 2002;2: 243-50.
- [133] Ceffa S, Erba F, Assane M, Coelho E, Calgaro M, Brando B. Panleucogating as an accurate and affordable flow cytometric protocol to analyse lymphocyte subsets among HIV-positive patients on HAART treatment in Mozambique. *J Biological Regulators Homeostatic Agents* 2003; 23:111-114.
- [134] Spandrio L. "Biochimica Clinica", ed. Sorbona, Milano, giugno 1989.
- [135] Wilson K, Walzer J. "Metodologia Biochimica", Raffaello Cortina Editore, Milano 2001.

- [136] Kern D, Collins M, Fultz T, et al. An enhanced-sensitivity branched DNA assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Micro* 1996; 34:3196-3202.
- [137] Cao Y, Ho DD, Todd J, et al. Clinical evaluation of branched DNA signal amplification for quantifying HIV type 1 in human plasma. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11:353-61.
- [138] Iuliano R, Forastieri G, Brizzi M, et al. HIV-plasma viral load detection by branched DNA signal amplification. *New Microbiol* 1995; 18:299-301.
- [139] UNAIDS. Technical Update, HIV Testing Methods, November 1977.
- [140] Elbeik T. Quantitative and cost comparison of ultra-sensitive Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Viral Load Assays: Bayer bDNA Quantiplex Versions 3.0 and 2.0 and Roche PCR Amplicor Monitor Version 1.5. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1113-1120.
- [141] Bayer. bDNA Quantiplex Versions 3.0 PI Rev. B, 2004-04.
- [142] World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual, III ed. 2004.
- [143] www.westgard.com
- [144] Wilber JC, Urdea MS. Quantification of viral nucleic acids using branched DNA signal amplification. In: *Molecular Methods for Virus Detection*. New York: Academic Press; 1996.p. 131-44.
- [145] Detmer J, Lagier R, Flynn J, Zayat C, Kolberg J, Collins M, et al. Accurate quantification of hepatitis C virus RNA from all genotypes by using branched-DNA technology. *J Clin Microbiol* 1996; 34:901-7.
- [146] Kern D, Collins M, Fultz T, Detmer J, Hamren S, Peterkin JJ, et al. An enhanced-sensitivity branched-DNA assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3196- 202.

[147] Ross RS, Viazov S, Sarr S, Hoffmann S, Kramer A, Roggendorf M. Quantitation of hepatitis C virus RNA by third generation branched DNA-based signal amplification assay. *J Virol Methods* 2002; 101:159- 68.

[148] Elbeik T, Surtihadi J, Destree M, Gorlin J, Holodniy M, Jortani SA, et al. Multicenter evaluation of the per180 RIMeL / IJLaM 2005; 1 formance characteristics of the Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay (bDNA). *J Clin Microbiol* 2004; 42: 563-9.

[149] Yao JD, Beld MG, Oon LL, Sherlock CH, Germer J, Menting S, et al. Multicenter evaluation of the VERSANT hepatitis B virus DNA 3.0 assay. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 800-6.

[150]: Erhardt A, Schaefer S, Athanassiou N, et al. Quantitative Assay of PCR-Amplified Hepatitis B Virus DNA Using a Peroxidase-Labelled DNA Probe and Enhanced Chemilluminescence. *J. Clin. Micr.* 1996; Vol. 34, Num. 8: 1885-1891.

[151]. De Maddalena C, Giambelli C, Tanzi E, Colzani D et al. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology* 2007. 365 (1), 113-124.

[152]. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp.* 1999 Ser. 41:95-98.

[153]. Blastn, [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

[154]. Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirol* 1995;38:24-34.

[155]. Norder H, Hammas B, Lodfdahl S, Courouce AM, Magnius LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and

genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 1992; 73:1201-8.

[156]. Kramvis A, Kew M, Francois G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 2005; 23:2407-21.

[157]. Thompson JD., Gibson TJ., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Ac. Res.* 1997; 25:4876-4882.

[158] Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version 2.3. Update 2009/20/05. Available at: <http://www.openepi.com>].

[159] Araujo NM, Branco-Vieira M, Silva ACM et al. Occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients: Evaluation of biochemical, virological and molecular parameters. *Hepatology Research* 2008; 38: 1194-1203.

[160] Bloquel B, Jeulin H, Burty C et al. Occult Hepatitis B Infection in Patients Infected With HIV: Report of Two Cases of Hepatitis B Reactivation and Prevalence in a Hospital Cohort. *J Med Vir* 2010; 82: 206-212.

[161] Gibney KB, Torresi J, Lemoh C, Biggs BA. Isolated Core Antibody Hepatitis B in Sub-Saharan African Immigrants. *J Med Vir* 2008; 80:1565-1569.

[162] Ke-Qin Hu. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hep* 2002; 9:243-257.

[163] Hofer M, Joller-Jemelka HI, Grob PJ, Lüthy R, Opravil M. Frequent chronic hepatitis B virus infection in HIV-infected patients positive for antibody to hepatitis B core antigen only. Swiss HIV Cohort Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998; 17(1):6-13.

[164] Giovanni Raimondo, Jean-Pierre Allain, Maurizia R. Brunetto et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 2008; 49: 652–657

[165] Sagnelli E, Imperato M, Coppola N et al. Dignosis and Clinical Impact of Occult Hepatitis B Infection in Patients with Biopsy Proven Chronic Hepatitis C: a Multicenter Study. *J Med Vir* 2008; 80:1547-1553.