



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO in *Epidemiologia, Ambiente e Sanità Pubblica*

CURRICULUM di *Igiene e Sanità Pubblica* - XXIX Ciclo

*Settore Scientifico Disciplinare: MED/42*

## **VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA E DELL'IMMUNOGENICITÀ A LUNGO TERMINE DELLA VACCINAZIONE ANTI-EPATITE B IN ITALIA: ATTUALITÀ E PROSPETTIVE FUTURE.**

Dottoranda:

Cristina GALLI  
matricola R10470

*Tutor:* Prof.ssa Luisa ROMANÓ

*Coordinatore del Dottorato:* Prof. Carlo LA VECCHIA

A.A. 2015-2016

# INDICE

<b>Abstract</b> .....	6
<b>Riassunto</b> .....	11
<b>Introduzione</b> .....	16
<u>Virus dell'epatite B</u> .....	18
Origine .....	18
Classificazione .....	20
Struttura del virione .....	22
Struttura del genoma virale .....	25
Proteine virali .....	29
Ciclo replicativo .....	34
Proprietà chimico-fisiche e caratteristiche biologiche .....	37
Variabilità genetica .....	39
<u>Infezione da HBV</u> .....	50
Modalità di trasmissione .....	50
Patogenesi .....	51
Sintomatologia .....	54
Diagnosi di laboratorio .....	55
Storia naturale dell'infezione .....	61
Infezione acuta .....	62
Infezione cronica .....	63

Epidemiologia .....	66
Terapia .....	73
Misure preventive .....	75
<b><u>Vaccini e strategie vaccinali anti-HBV</u></b> .....	<b>77</b>
Vaccini anti-HBV .....	77
Sicurezza, efficacia ed immunogenicità dei vaccini anti-HBV .....	79
Strategie vaccinali ed impatto globale della vaccinazione anti-HBV .....	81
La vaccinazione anti-HBV in Italia .....	84
<b>Scopo della Tesi</b> .....	<b>86</b>
<b><i>Studio 1: Valutazione dell'immunogenicità a lungo termine</i></b> <b>    contro il virus dell'epatite B conferita dai</b> <b>    vaccini monovalenti sul territorio italiano</b> .....	<b>88</b>
<b><u>Premessa</u></b> .....	<b>89</b>
<b><u>Obiettivo dello Studio</u></b> .....	<b>90</b>
<b><u>Disegno dello Studio</u></b> .....	<b>90</b>
<b><u>Materiali e Metodi</u></b> .....	<b>94</b>
Prelievi di sangue .....	94
Test sierologici e molecolari .....	94
Test sierologici .....	94
Immunodosaggio anti-HBs .....	95
Immunodosaggio anti-HBc .....	97

Immunodosaggio HBsAg .....	99
Test molecolari .....	101
Real time PCR per HBV-DNA .....	101
Analisi Statistica .....	104
<b><u>Risultati</u></b> .....	105
Risultati dell'arruolamento: caratteristiche della popolazione .....	106
Risultati visita 1: anti-HBs test 1 (pre-booster) ed anti-HBc .....	107
Risultati visita 2: somministrazione del booster .....	108
Risultati visita 3: anti-HBs test 2 (post-booster) .....	109
Risultati visita 4: secondo ciclo vaccinale .....	110
Risultati visita 5: anti-HBs test 3 (post-ciclo vaccinale secondario) .....	111
<b><i>Studio 2: Valutazione dell'immunogenicità a lungo termine</i></b> <b>    contro il virus dell'epatite B conferita dai</b> <b>    vaccini esavalenti sul territorio italiano</b> .....	112
<b><u>Premessa</u></b> .....	113
<b><u>Obiettivi dello Studio</u></b> .....	114
<b><u>Disegno dello Studio</u></b> .....	115
<b><u>Materiali e Metodi</u></b> .....	120
Prelievi di sangue .....	120
Test sierologici e molecolari .....	120
Valutazione degli eventi avversi post-challenge .....	121
Analisi Statistica .....	123

<b><u>Risultati</u></b> .....	125
Selezione - Arruolamento - Inclusione allo studio .....	125
Caratteristiche della popolazione in studio .....	127
Immunogenicità dei vaccini esavalenti .....	128
Profilo di sicurezza del vaccino HBVAXPRO .....	130

**Studio 3: Valutazione epidemiologica delle epatiti acute  
da HBV in Italia dopo l'introduzione della  
vaccinazione universale anti-epatite B** .....

<b><u>Premessa</u></b> .....	134
<b><u>Obiettivi dello Studio</u></b> .....	135
<b><u>Disegno dello Studio</u></b> .....	136
<b><u>Materiali e Metodi</u></b> .....	138
Sistema di Sorveglianza SEIEVA .....	138
Test virologici .....	142
Estrazione di HBV-DNA .....	142
Amplificazione del DNA virale mediante nested-PCR (in house) .....	144
Visualizzazione dei prodotti di amplificazione .....	145
Sequenziamento ed analisi filogenetica .....	146
Analisi di mutanti virali .....	148
Analisi Statistica .....	148
<b><u>Risultati</u></b> .....	149
Popolazione arruolata .....	149

Casi di epatite B acuta in non vaccinati .....	150
Casi di epatite B acuta in vaccinati .....	152
Caratterizzazione molecolare dei ceppi infettanti i casi opportunamente vaccinati .....	154
<b>Conclusioni</b> .....	159
<b>Bibliografia</b> .....	180

# *ABSTRACT*

# ABSTRACT

## INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) is a partially double stranded DNA virus of the *Hepadnaviridae* family which includes related viruses responsible for liver injuries in animals. On the basis of genetic variability, human HBV strains are currently divided into 8 major (A-H) and 2 minor (I-J) genotypes with a different geographical distribution.

HBV is mainly carried in blood but also in other body fluids such as saliva, semen and vaginal secretions. It is usually transmitted by vertical route in developing and highly endemic countries and by horizontal route, especially by unsafe sexual contacts and intravenous drug use, in developed countries with low or intermediate endemicity.

Nowadays, hepatitis B is a potentially life-threatening liver infection because safe and effective vaccines are available since '80s. However, such infection is still a serious public health problem worldwide. It is a leading cause of acute and chronic liver disease. Currently about 240 million people are estimated to be chronically infected with HBV and more than 686,000 individuals die each year due to HBV-related liver complications, including cirrhosis and liver cancer. Vaccination is the most effective and economically favourable measure to control and prevent hepatitis B on global scale.

The viral genome (HBV-DNA) consists of 4 partially overlapping Open Reading Frames (ORFs): in particular ORF pre-C/C encodes for the core protein (HBc) and ORF pre-S/S encodes for the enveloped proteins, among which the most represented is the viral surface antigen (HBsAg). Specific antibodies against hepatitis B core protein (anti-HBc) generally indicate a natural exposure to HBV. Instead, HBsAg is the main component of the currently hepatitis B vaccines since it contains the viral antigenic determinant common to all HBV strains, called  $\alpha$  determinant, which induces the host immune system to produce specific neutralizing anti-HBs antibodies able to recognize the viral protein HBsAg in its original conformation, thus conferring protection. HBV strains with mutations within the  $\alpha$  determinant can cause breakthrough infections also in immunized subjects.

In Italy, hepatitis B vaccination started in 1983 targeted to individuals at increased risk of infection and then became mandatory in 1991 for all infants and, until the end of 2003, also for 12-year-olds. The first hepatitis B vaccines were plasma-derived, soon replaced by monovalent vaccines manufactured by recombinant DNA technology. These vaccines were proven to be highly immunogenic and able to confer seroprotection (anti-HBs concentration  $\geq 10$  IU/l after primary immunisation with a 3-dose vaccination series) in over 90-95% of healthy children and adults. However their long-term protection is still a debated issue.

Moreover, from the XXIX century combined vaccines started to be used for infant immunisation. In 2000, two hexavalent vaccines (Hexavac®, Sanofi Pasteur MSD and Infanrix® Hexa, GlaxoSmithKline) were licensed in Europe for primary immunisation of children against diphtheria, tetanus, pertussis, poliomyelitis, hepatitis B and Haemophilus influenzae B. In 2005, the marketing authorization of Hexavac vaccine was suspended by the European Medicines Agency (EMA) because of concerns



about the long-term immunogenicity of its hepatitis B component. A surveillance programme has been undertaken to verify the long-term protection against HBV conferred by such hexavalent vaccine.

Up till now, the Italian hepatitis B vaccination strategy was a success: in fact it has drastically reduced the incidence of acute infections and the rate of serological HBV markers. However, this policy needs to be constantly monitored to verify its impact in keeping the infection under control. This PhD thesis resumes the results of 3 different studies conducted in order to assess the efficacy of hepatitis B vaccines and vaccination in our country.

## **AIMS**

*Study 1:* to assess the persistence of humoral and cellular immunity conferred by monovalent hepatitis B vaccines 18-19 years after primary vaccination (3 doses) in healthy individuals primed as infants (first year of age) or adolescents (12 years old), respectively.

*Study 2:* a) to assess the antibody persistence and immune response to a challenge dose of monovalent DNA recombinant hepatitis B vaccine (HBVAXPRO 5 µg) in healthy pre-adolescents primed 10 years earlier with a primary series (3 doses) of hexavalent vaccines, either Hexavac or Infanrix Hexa; b) to evaluate the safety profile of the monovalent hepatitis B vaccine, HBVAXPRO 5µg/0.5ml, used as challenge in this study.

*Study 3:* to assess the proportion of successfully vaccinated individuals among cases with acute hepatitis B, the proportion of preventable cases if individuals were vaccinated as recommended, and the reasons for immunisation failures in Italy during the 22 years period (1993-2014) after the implementation of universal hepatitis B vaccination.

## **METHODS AND RESULTS**

*Study 1:* Eight hundred fourteen subjects were enrolled, 405 teenagers (49.8%) vaccinated as infants and 409 young adults (50.2%) vaccinated as adolescents. All vaccinees were tested for anti-HBs and anti-HBc antibodies (AxSYM AUSAB and AxSYM CORE, Abbott, USA); serum samples found anti-HBc positive were further tested for HBsAg (AxSYM HBsAg V2, Abbott, USA) and HBV-DNA (Cobas TaqMan HBV Test for use with the High Pure System, Roche, USA). Eight young adults were found positive for anti-HBc alone, and were excluded from analysis. Individuals with anti-HBs concentration  $\geq 10$  IU/l were considered protected while those with anti-HBs concentration  $< 10$  IU/l were offered a booster dose and re-tested 2 weeks later. Overall, 67.9% individuals showed anti-HBs concentrations pre-booster  $\geq 10$  IU/l (48.9% among teenagers vs 87.0% among young adults;  $p < 0.001$ ). The antibody geometric mean concentration (GMC) was significantly higher for individuals vaccinated as adolescents than for individuals immunized as infants (102.5 IU/l vs 6.9 IU/l;  $p < 0.001$ ). When boosted, 94.2% of teenagers and 94.7% of young adults showed an anamnestic response ( $p = n.s.$ ). Post-booster GMCs were similar in both groups (respectively 477.9 IU/l vs 710.0 IU/l,  $p = n.s.$ ). Subjects with anti-HBs post-booster  $< 10$  IU/l were offered to complete a second vaccination course: 54.5% was immunized and all of them showed an antibody protective titre 1-3 months after the third vaccine dose.

*Study 2:* Seven hundred fifty-one pre-adolescents (11-13 years old) immunized as infants with hexavalent vaccines (Hexavac or Infanrix Hexa) were enrolled, and received a challenge dose of monovalent anti-hepatitis B vaccine HBVAXPRO. In total, 749 individuals (99.7%) completed the study (408 in the Hexavac cohort and 341 in the Infanrix Hexa), but 17 were excluded from the further analysis because of deviations in the trial protocol: especially 10 of them (6 in the Hexavac group and 4 in the Infanrix Hexa) were anti-HBc positive without other virological markers (HBsAg and HBV-DNA negative). The remaining 732 subjects, 396 in the Hexavac cohort and 336 in the Infanrix Hexa, were included in the analysis to evaluate the long-term immunogenicity of the two hexavalent vaccines. Ten years after primary vaccination series, only 44.7% had anti-HBs concentration  $\geq 10$  IU/l: the frequency of vaccinees with a protective antibody titre was significant lower in the Hexavac cohort than in the Infanrix Hexa (24.0% vs 69.0%; 95%CI: 19.7-28.4 vs 63.8-74.0). One month after the administration of the challenge dose, 89.5% of pre-adolescent included in the study were protected against HBV, but the percentage of seroprotected was still significant lower in the Hexavac group than in the Infanrix Hexa (83.6% vs 96.4%; 95%CI: 79.6-87.1 vs 93.8-98.1). Pre and post-challenge GMCs and post/pre-challenge GMCR of anti-HBs concentrations reflected the same trend. However, considering the proportion of subjects who showed an anamnestic response by achieving post-challenge anti-HBs concentration  $\geq 10$  IU/l in the subgroup of individuals with anti-HBs pre-challenge  $< 10$  IU/l, there was no statistically significant difference between the two cohorts (78.4% vs 88.5%; 95%CI: 73.6-83.2 vs 80.7-93.9, respectively).

All the enrolled pre-adolescents, except one lost during the follow up, were analysed to evaluate the safety profile of the HBVAXPRO 5 $\mu$ g/0.5ml (n=750). Overall 46.1% of subjects experienced at least one adverse event: 40.7% had an injection-site adverse reaction, all reactions were vaccine-correlated and the most frequent was pain (39.3%); instead 11.7% had a systemic adverse event, but only 1.9% was vaccine-induced. Two serious adverse events were reported during the study, none of them was considered by the centre-investigator as related to the HBVAXPRO injection. No death and no subject was withdrawn from the study due to an adverse event.

*Study 3:* Data concerning acute hepatitis B cases reported to the Italian Surveillance System for Acute Viral Hepatitis (SEIEVA) from 1993 to 2014 were analysed. A total of 11,311 cases were enrolled in the study: 10,949 (96.8%) were unvaccinated instead 362 (3.2%) received at least one dose of hepatitis B vaccine. Among the 10,949 unvaccinated cases, 213 (1.9%) escaped mandatory vaccination and 2,821 (25.8%) were not vaccinated despite being at increased risk of infection. Among the latter, the most common risk factors were intravenous drug use, cohabitation with a HBsAg carriers and homosexual/bisexual practices. Almost 37% of the unvaccinated households with HBsAg carriers were aware of their risk. Lack of trust in the vaccination, negative attitude and inaccurate beliefs followed by lack or poor communication and low perceived severity of the disease were the most frequent reasons for vaccine hesitancy. Among the 362 cases vaccinated with at least one vaccine dose, 277 (76.5%) had available immunisation data: 227 (81.9%) were not properly vaccinated, in particular 76 received an uncorrected immunisation series in terms of time and dose of vaccine administration; instead 50 cases (18.1%) received a complete vaccination course according to the correct schedule and before exposure to HBV. Molecular characterisation of 17 of these latter cases by in-house methods showed that 6 were infected with S-gene mutants and 3 of them were also seroprotected (anti-HBs  $\geq 10$  IU/l).

## **CONCLUSIONS**

*Study 1:* Strong immunological memory persists for at least 18-19 years after immunization of infants or adolescents with a primary course of vaccination with monovalent anti-hepatitis B vaccines. Thus, booster doses are not needed at this time, but additional follow up is required to assess the long-life longevity of protection.

*Study 2:* Over 80% of pre-adolescents showed persistence of the humoral and/or cellular immunity against HBV one month after a challenge dose of HBVAXPRO given 10 years after priming either with Hexavac or Infanrix Hexa. Overall, the Infanrix Hexa group showed a better antibody and immune memory persistence than the Hexavac group. However, a small proportion of subjects in both cohorts seems to have lost the protection against hepatitis B. Further studies will be necessary to clarify this crucial public health issue. Overall, the challenge dose of HBVAXPRO was well-tolerated.

*Study 3:* Development of acute hepatitis B in successfully vaccinated individuals is a rare event. Infections caused by vaccine-escape S gene viral mutants are infrequent. Further efforts are essential on one hand to avoid hepatitis B cases when a full and timely vaccination is possible, on the other hand to achieve and maintain a high level of public confidence in the safety and efficacy of hepatitis B vaccination, especially among individuals at increased risk of HBV infection, in order to reach high coverage rates (herd immunity) to protect the single person and especially the entire community.

# *RIASSUNTO*

# RIASSUNTO

## INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite B è un virus a DNA a doppio filamento incompleto appartenente alla famiglia delle *Hepadnaviridae* che include virus animali responsabili di danni epatici. Sulla base della variabilità genetica, i ceppi di HBV umano sono attualmente suddivisi in 8 genotipi maggiori (A-H) e 2 minori (I-J) con una differente distribuzione geografica.

HBV è contenuto principalmente nel sangue, ma anche in altri fluidi corporei come lo sperma e le secrezioni vaginali. È generalmente trasmesso per via verticale nei Paesi in via di sviluppo e ad alta endemia, e per via orizzontale, specialmente attraverso rapporti sessuali non protetti e tossicodipendenza, nei Paesi sviluppati con livello di endemicità basso o intermedio.

Oggi, l'epatite virale di tipo B è una malattia potenzialmente prevenibile con la vaccinazione poiché vaccini sicuri ed efficaci sono a disposizione dai primi anni '80. Tuttavia, l'infezione è ancora un rilevante problema di sanità pubblica a livello mondiale in quanto costituisce la principale causa di malattia epatica acuta e cronica. Attualmente è stato stimato che sono circa 240 milioni gli individui cronicamente infetti da HBV e più di 686,000 persone muoiono ogni anno a causa delle complicanze epatiche HBV-correlate, tra cui la cirrosi e l'epatocarcinoma. La vaccinazione è la misura più efficace sia dal punto di vista clinico sia economico per il controllo e la prevenzione dell'epatite B su scala globale.

Il genoma virale (HBV-DNA) è costituito da 4 Open Reading Frames (ORFs) parzialmente sovrapposte: in particolare l'ORF pre-C/C codifica per la proteina del core (HBc) e l'ORF pre-S/S codifica per le proteine dell'envelope virale, tra le quali la più rappresentata è l'antigene di superficie di HBV (HBsAg). Anticorpi specifici contro HBc (anti-HBc) indicano generalmente un'esposizione naturale all'agente patogeno. Invece, HBsAg è il principale componente degli attuali vaccini anti-epatite B poiché contiene il determinante antigenico virale comune a tutti i ceppi di HBV, denominato determinante  $\alpha$ , che induce il sistema immunitario dell'ospite a produrre specifici anticorpi anti-HBs neutralizzanti in grado di riconoscere la proteina virale HBsAg in conformazione originale, conferendo protezione contro l'infezione. Ceppi di HBV con mutazioni nel determinante  $\alpha$  possono causare l'insorgenza di nuove infezioni in soggetti immunizzati.

In Italia, la vaccinazione anti-epatite B è iniziata nel 1983 per gli individui a maggior rischio di contrarre l'infezione ed è poi diventata obbligatoria per tutti i nuovi nati e, fino al 2003, anche per i dodicenni. I primi vaccini anti-epatite B erano plasma-derivati, rapidamente sostituiti da composizioni vaccinali monovalenti ottenute mediante la tecnologia del DNA ricombinante. Questi vaccini si sono rivelati altamente immunogeni ed in grado di conferire sieroprotezione (definita come concentrazione di anticorpi anti-HBs  $\geq 10$  UI/l dopo un'immunizzazione primaria costituita da 3 dosi di vaccino) in oltre il 90-95% dei bambini e dei giovani adulti sani. Tuttavia, la persistenza a lungo termine della protezione conferita da questi vaccini è ancora oggi una questione dibattuta.

Inoltre, a partire dal XXIX secolo, vaccini combinati sono stati introdotti per la vaccinazione dell'infanzia. Nel 2000 due vaccini esavalenti (Hexavac®, Sanofi Pasteur MSD ed Infanrix® Hexa, GlaxoSmithKline) sono stati messi in commercio in Europa per l'immunizzazione di bambini contro difterite, tetano, pertosse, poliomielite, epatite B e le malattie invasive causate dall'*Haemophilus influenzae* B; tuttavia nel 2005 il vaccino Hexavac, su raccomandazione dell'Agenzia Europea del Farmaco (EMA), è stato sospeso dal commercio poiché ritenuto responsabile di indurre una risposta sub-ottimale nei confronti della componente antigenica anti-epatite B. Da allora è stato intrapreso un programma di sorveglianza per verificare la protezione a lungo-termine conferita da tale vaccino nei confronti di HBV.

Fino ad oggi, la strategia italiana di vaccinazione contro l'epatite B si è rivelata un successo, poiché ha drasticamente ridotto l'incidenza delle infezioni acute e la prevalenza dei marcatori sierologici di HBV. Tuttavia tale politica vaccinale necessita di un continuo monitoraggio per verificare il suo impatto nel mantenere l'infezione sotto controllo. Questo lavoro di tesi di dottorato riassume i risultati ottenuti da 3 differenti studi condotti al fine di valutare l'efficacia dei vaccini e della vaccinazione anti-epatite B nel nostro Paese.

## **SCOPO**

*Studio 1:* valutare la persistenza dell'immunità umorale e cellulare conferita dai vaccini anti-epatite B monovalenti 18-19 anni dopo il ciclo vaccinale primario (3 dosi) in individui sani immunizzati rispettivamente da bambini (primo anno di vita) o da adolescenti (12 anni).

*Studio 2:* a) valutare la persistenza degli anticorpi e la risposta immune ad una dose challenge di vaccino ricombinante monovalente anti-epatite B (HBVAXPRO 5 µg) in pre-adolescenti sani immunizzati 10 anni prima con una serie vaccinale primaria (3 dosi) di vaccini esavalenti, Hexavac o Infanrix Hexa; b) valutare il profilo di sicurezza del vaccino monovalente anti-epatite B, HBVAXPRO 5µg/0.5ml, impiegato come challenge.

*Studio 3:* stimare la proporzione di individui opportunamente vaccinati tra i casi di epatite B acuta notificati in Italia, determinare la proporzione di casi che si sarebbero evitati se fosse stata rispettata la schedula vaccinale prevista per l'immunizzazione anti-epatite B, e valutare le ragioni del fallimento vaccinale nel periodo post-immunizzazione universale anti-HBV (1993-2014) sul territorio italiano.

## **METODI E RISULTATI**

*Studio 1:* Sono stati arruolati 814 soggetti, 405 ragazzi (49.8%) vaccinati da bambini e 409 giovani adulti (50.2%) vaccinati da dodicenni. Tutti i vaccinati sono stati testati per anti-HBs ed anti-HBc (AxSYM AUSAB e AxSYM CORE, Abbott, USA); i campioni di siero anti-HBc positivi sono stati ulteriormente saggiati per HBsAg (AxSYM HBsAg V2, Abbott, USA) e HBV-DNA (Cobas TaqMan HBV Test for use with the High Pure System, Roche, USA). Otto giovani adulti sono risultati anti-HBc positivi, ma negativi agli altri marcatori virali; tali soggetti sono stati esclusi dalla successiva analisi. Gli individui con concentrazione di anti-HBs  $\geq 10$  UI/l sono stati considerati protetti contro HBV mentre a tutti coloro con anti-HBs  $< 10$  UI/l è stata offerta una dose booster di vaccino anti-epatite B e sono stati ritestati dopo due settimane. Complessivamente, il 67.9% dei soggetti in studio ha

mostrato concentrazioni di anti-HBs pre-booster  $\geq 10$  UI/l (48.9% tra i ragazzi vs 87.0% tra i giovani adulti). La media geometrica delle concentrazioni anticorpali (GMC) era significativamente più alta per i soggetti vaccinati da adolescenti rispetto a quelli immunizzati da bambini (102.5 UI/l vs 6.9 UI/l;  $p < 0.001$ ). A seguito della somministrazione del booster, il 94.2% dei ragazzi ed il 94.7% dei giovani adulti ha mostrato una risposta anamnesticca. I valori di GMC post-booster erano simili nei due gruppi (rispettivamente 477.9 UI/l vs 710.0 UI/l;  $p = n.s.$ ). Ai soggetti con anti-HBs post-booster  $< 10$  UI/l è stato offerto il completamento di un secondo ciclo vaccinale anti-epatite B: il 54.5% è stato immunizzato e tutti hanno mostrato un titolo anticorpale protettivo 1-3 mesi dopo la terza dose di vaccino.

*Studio 2:* Sono stati arruolati 751 pre-adolescenti (11-13 anni) vaccinati nell'infanzia con vaccino esavalente (Hexavac o Infanrix Hexa) cui è stata somministrata una dose challenge di vaccino monovalente anti-epatite B HBVAXPRO. In totale, 749 individui (99.7%) hanno completato lo studio (408 nella coorte Hexavac e 341 nella coorte Infanrix Hexa) mentre 17 sono stati esclusi dalla successiva analisi a causa di deviazioni rispetto al protocollo del trial: in particolare 10 soggetti (6 nella coorte Hexavac e 4 nella coorte Infanrix Hexa) sono risultati anti-HBc positivi senza nessun altro marcatore virologico (HBsAg e HBV-DNA negativi). I restanti 732 soggetti, 396 nella coorte Hexavac e 336 nella coorte Infanrix Hexa, sono stati inclusi nell'analisi per valutare l'immunogenicità a lungo termine dei due vaccini esavalenti. Dieci anni dopo il ciclo di immunizzazione primario, solo il 44.7% aveva concentrazioni di anti-HBs  $\geq 10$  UI/l: la frequenza di vaccinati con titolo anticorpale protettivo era significativamente più bassa nella coorte Hexavac rispetto a quella Infanrix Hexa (24.0% vs 69.0%; IC95%: 19.7-28.4 vs 63.8-74.0). Un mese dopo il challenge, l'89.5% dei pre-adolescenti inclusi nello studio è risultato protetto contro HBV, ma la percentuale di sieroprotetti rimaneva significativamente più bassa nel gruppo Hexavac rispetto al gruppo Infanrix Hexa (83.6% vs 96.4%; IC95%: 79.6-87.1 vs 93.8-98.1). Anche i valori di GMCs pre- e post-challenge ed il GMCR post-/pre-challenge riflettevano la stessa tendenza. Tuttavia, considerando la proporzione di soggetti che hanno mostrato una risposta anamnesticca con anti-HBs post-challenge  $\geq 10$  UI/l nel sottogruppo di individui con anti-HBs  $< 10$  UI/l pre-challenge, non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa tra le due coorti (rispettivamente 78.4% vs 88.5%; IC95%: 73.6-83.2 vs 80.7-93.9).

Tutti i pre-adolescenti arruolati, fatta eccezione per un soggetto perso durante il follow up, sono stati inclusi nell'analisi del profilo di sicurezza del vaccino HBVAXPRO 5 $\mu$ g/ml ( $n=750$ ). Complessivamente, il 46.1% dei soggetti aveva manifestato almeno un evento avverso: il 40.7% aveva una reazione avversa al sito di iniezione, tutte le reazioni erano vaccino-correlate e la più frequente risultava il dolore (39.3%); invece l'11.7% aveva avuto un evento avverso sistemico, ma solo l'1.9% risultava vaccino-indotto. Due eventi avversi severi si sono verificati nel corso dello studio, nessuno dei quali è stato considerato correlato all'iniezione di HBVAXPRO dal responsabile del centro di arruolamento. Non sono stati registrati decessi e nessun soggetto è stato escluso dallo studio per l'insorgenza di eventi avversi.

*Studio 3:* Sono stati analizzati i dati inerenti i casi di epatite B acuta riportati al Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA) dal 1993 al 2014. In totale, 11,311 casi sono stati analizzati per lo studio: 10,949 (96.8%) si riferivano a soggetti non vaccinati, mentre 362

(3.2%) si riferivano ad individui che avevano ricevuto almeno una dose di vaccino anti-epatite B. Tra i 10,949 casi non vaccinati, 213 (1.9%) erano sfuggiti alla vaccinazione dell'obbligo e 2,821 (25.8%) non erano vaccinati seppur a maggior rischio di contrarre l'infezione. In quest'ultimo gruppo, i principali fattori di rischio erano la tossicodipendenza, la convivenza con portatore di HBsAg ed i rapporti sessuali non protetti tra omosessuali o bisessuali. Quasi il 37% dei non vaccinati tra i conviventi di portatori di HBsAg era però conscio dello stato infettivo del proprio convivente. La mancanza di fiducia, l'attitudine negativa e le errate convinzioni nei confronti della vaccinazione, seguiti dalla mancata o insufficiente comunicazione e dalla scarsa percezione della severità della malattia sono risultate le motivazioni più frequenti della mancata vaccinazione anti-epatite B. Tra i 362 casi di soggetti immunizzati con almeno una dose di vaccino, per 277 (76.5%) erano disponibili informazioni sulla vaccinazione: 227 (81.9%) non erano stati opportunamente vaccinati, in particolare 76 avevano ricevuto un'immunizzazione primaria scorretta in termini di tempi e dosi di somministrazione del vaccino; invece in 50 casi (18.1%) i soggetti avevano ricevuto un ciclo vaccinale primario completo secondo la scheda vaccinale raccomandata prima dell'esposizione a HBV. La caratterizzazione molecolare di 17 di questi ultimi casi ha mostrato che 6 erano infetti da virus mutanti del gene S, 3 dei quali risultavano sieroprotetti (anti-HBs  $\geq 10$  UI/l).

## **CONCLUSIONI**

*Studio 1:* La memoria immunologica per HBV persiste per almeno 18-19 anni dall'immunizzazione primaria con vaccini anti-epatite B monovalenti in soggetti vaccinati da bambini o dodicenni. Pertanto, ad oggi non serve raccomandare la somministrazione di dosi booster di vaccino anti-epatite B; studi futuri sono però necessari per verificare la persistenza a lungo-termine della protezione conferita da tali vaccini.

*Studio 2:* Oltre l'80% dei pre-adolescenti studiati ha mostrato la persistenza dell'immunità umorale e/o cellulare contro HBV un mese dopo la somministrazione di una dose challenge di HBVAXPRO a 10 anni di distanza dalla serie di immunizzazione primaria con vaccini esavalenti. Complessivamente, il gruppo di vaccinati con Infanrix Hexa mostrava una migliore persistenza di anticorpi e memoria immunologica rispetto ai vaccinati con Hexavac. Tuttavia, una piccola proporzione di soggetti in entrambe le coorti sembra aver perso protezione contro l'epatite B. Studi futuri sono dunque necessari per chiarire questa questione cruciale di sanità pubblica. Complessivamente, il vaccino HBVAXPRO si è rivelato ben tollerato.

*Studio 3:* L'insorgenza di epatite B acuta tra individui opportunamente vaccinati è un evento raro. Le infezioni causate da mutanti virali nel gene S in grado di eludere la risposta immunitaria indotta da vaccino non sono frequenti. Ulteriori sforzi futuri sono necessari da un lato per evitare l'insorgenza di casi di epatite B acuta quando è possibile una vaccinazione completa e corretta in termini di tempi e dosi di somministrazione del vaccino, dall'altro lato per raggiungere e mantenere un elevato livello pubblico di fiducia in merito alla sicurezza ed all'efficacia della vaccinazione anti-epatite B, soprattutto tra gli individui a maggior rischio di infezione, al fine di raggiungere alti tassi di copertura vaccinale (immunità di gregge) per proteggere il singolo individuo e specialmente l'intera comunità.



# *INTRODUZIONE*

# INTRODUZIONE

Le epatiti sono processi infiammatori acuti o cronici a carico del fegato causati da virus, batteri, sostanze esogene (per esempio farmaci) oppure alterazioni metaboliche.

In Italia, le epatiti virali sono malattie di Classe II, ovvero ad elevata frequenza e/o passibili di misure di controllo, pertanto sono soggette a notifica obbligatoria<sup>1</sup>. Pur presentando sintomatologia comune, le epatiti virali differiscono notevolmente dal punto di vista eziologico, epidemiologico, immunologico e patologico.

Il virus dell'epatite B (HBV) è uno dei 5 principali virus epatotropi causa di epatite virale di tipo B (Figura 1). Si tratta di un virus a DNA appartenente alla famiglia *Hepadnaviridae*. Può essere trasmesso sia per via verticale sia orizzontale (parenterale o sessuale). Causa generalmente un'infezione acuta asintomatica o con sintomatologia lieve che può risolversi spontaneamente o può cronicizzare evolvendo in gravi patologie a carico del fegato quali cirrosi ed epatocarcinoma, terza causa di morte per tumore a livello mondiale. Tuttavia la sintomatologia, la prognosi e la gravità della malattia sono correlate all'età di acquisizione dell'infezione.

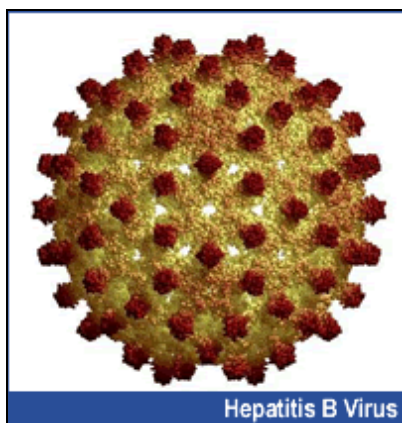


Figura 1: Virus dell'epatite B (HBV).

Nonostante l'epatite virale di tipo B risulta essere tutt'oggi un rilevante problema di sanità pubblica a livello mondiale, fin dagli anni '80 è una malattia prevenibile con la vaccinazione. Notevoli progressi sono stati fatti negli anni '90 con l'introduzione di piani vaccinali universali mirati all'immunizzazione di tutti i nuovi nati e/o degli adolescenti che hanno permesso una riduzione non solo dell'incidenza dell'infezione ma anche dello sviluppo di gravi malattie epatiche HBV-correlate<sup>2</sup>.

La piena comprensione del ruolo svolto da HBV nella storia naturale dell'infezione richiede un'accurata conoscenza di ogni suo aspetto fisiopatologico, clinico ed epidemiologico. Importante è inoltre la conoscenza delle misure preventive che, in Italia, hanno permesso di arrivare ad una fase di controllo dell'infezione.

## **VIRUS DELL'EPATITE B**

### **Origine**

Il virus dell'epatite B (HBV) è stato il primo virus causa di epatite nell'uomo di cui sono state identificate e caratterizzate le proteine ed il genoma virale.

La prima descrizione di "*epidemia itterica*" è stata attribuita ad Ippocrate circa 2500 anni fa (ca 400 a.C.). Alcune centinaia di anni più tardi (VIII secolo d.C.), Papa Zaccaria mise in quarantena soggetti con chiari segni di itterizia al fine di prevenire la diffusione della malattia in tutta Roma, suggerendo la natura infettiva di tale patologia.

Solo in tempi moderni è stata fatta chiarezza sulle modalità di trasmissione dell'epatite virale. Nonostante l'agente eziologico fosse ancora ignoto, nel 1885 Lurman pubblicò un lavoro in cui osservò che, durante un'epidemia di vaiolo verificatasi a Brema nel 1883, tra i 1289 lavoratori di un cantiere navale vaccinati con siero di persone immuni al vaiolo, 191 soggetti immunizzati con lo stesso pool di siero si ammalarono di itterizia e fu loro diagnosticata ciò che all'epoca fu chiamata "*malattia da siero*". Invece, i restanti lavoratori vaccinati con pool differenti rimasero sani. L'opera di Lurman viene tutt'oggi considerata un classico esempio di studio epidemiologico, in cui è stato dimostrato che il siero contaminato è l'origine del focolaio epidemico<sup>3</sup>.

Nel 1908, McDonald pubblicò l'ipotesi che tale infezione itterica potesse avere eziologia virale e successivamente, con l'introduzione dell'uso dell'ago ipodermico, numerose "*epidemie di epatite*" sono state riportate durante tutta la prima metà del XX secolo, specialmente nei periodi di guerra quando erano più scarse le condizioni igienico-sanitarie<sup>4</sup>.

A seguito della Seconda Guerra Mondiale, studi epidemiologici condotti in Inghilterra e Stati Uniti d'America hanno rivelato l'esistenza di due tipi diversi di trasmissione di epatite virale: un'epatite, definita di tipo A, principalmente trasmessa per via feco-orale ed un'epatite, definita di tipo B, trasmessa per via parenterale (come la malattia da siero descritta precedentemente da Lurman).

E' solo durante gli anni '60 che è stato scoperto l'agente patogeno responsabile dell'epatite virale di tipo B. Nel 1963, è stato identificato per la prima volta nel sangue di un aborigeno australiano un antigene precedentemente sconosciuto e quindi definito "*antigene Australia*" (AuAg). Pochi anni dopo, evidenze scientifiche provarono la correlazione tra la l'epatite virale per trasmissione parenterale e la presenza di AuAg in circolo nei soggetti infetti. Solo nel 1970, grazie a studi di microscopia elettronica, Dane osservò nel siero di individui con epatite di tipo B la presenza di particelle simil-virali rivestite in superficie dall'antigene Australia<sup>5</sup>. La natura virale della particella di Dane è stata confermata dalla successiva scoperta del genoma virale e di una DNA polimerasi endogena. La particella di Dane fu quindi considerata essere il virus dell'epatite B (HBV) e l'antigene Australia è stato definito come antigene di superficie di HBV (HBsAg)<sup>6,7</sup>.

A partire dagli anni '70 una serie di misure di prevenzione hanno permesso di ridurre l'impatto globale dell'epatite virale di tipo B. In particolare, è iniziato lo sviluppo dei primi test di screening e diagnostici per HBsAg, che hanno subito contribuito ad una forte diminuzione dell'incidenza delle

infezioni trasmesse per via parenterale/trasfusionale, e sono stati sperimentati i primi vaccini anti-epatite B derivati dal plasma di portatori sani dell'infezione. Nei successivi anni '80 è stato sequenziato per la prima volta il genoma virale e sono stati prodotti i primi vaccini ricombinanti anti-epatite B. Nello stesso periodo e con l'inizio degli anni '90 sono stati approvati ed introdotti in commercio i primi farmaci anti-virali contro HBV<sup>8</sup> (Figura 2).

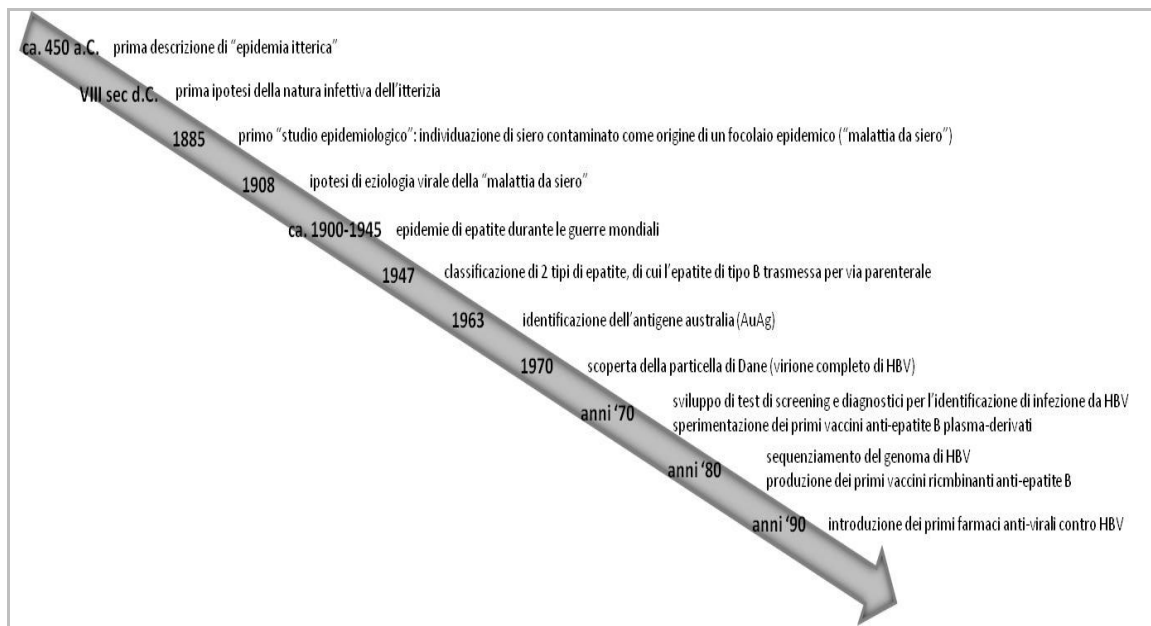


Figura 2: Principali tappe della ricerca scientifica in merito al virus dell'epatite B (HBV).

## Classificazione

Il virus dell'epatite B appartiene alla famiglia delle *Hepadnaviridae*, di cui ne è il prototipo. I precursori di HBV sembrano aver avuto origine più di 82 milioni di anni fa, così come testimoniato dall'identificazione in uccelli preistorici del Mesozoico<sup>9</sup>.

Dal punto di vista filogenetico, la famiglia delle *Hepadnaviridae* è oggi suddivisa in due generi (Figura 3):

- *Orthohepadnavirus* che infettano i mammiferi (come uomo, primati, marmotte e scoiattoli di terra)
- *Avihepadnavirus* che infettano gli uccelli (come anatre, oche, gru, aironi selvatici e pappagalli)

Studi filogenetici suggeriscono che HBV esiste nell'uomo da almeno 33,600 anni<sup>10</sup>. L'isolato virale umano più antico finora conosciuto è stato rilevato nel XVI secolo per via laparoscopica dalla biopsia epatica di una mummia coreana<sup>11</sup>. I ceppi virali più simili ad HBV umano sono quelli che infettano i primati, ma elevata omologia di sequenza è stata riscontrata anche con i ceppi di altri *Orthohepadnavirus*. I ceppi virali del genere *Avihepadnavirus* presentano invece maggiore distanza genetica rispetto ai ceppi umani, pur possedendo simile organizzazione genomica<sup>12</sup>.

Tutti i membri della famiglia *Hepadnaviridae* hanno un ristretto spettro d'ospite (elevata specie-specificità), tuttavia condividono due caratteristiche principali da cui deriva il nome della famiglia stessa: sono virus con spiccato tropismo per le cellule epatiche e possiedono un genoma a DNA a doppio filamento circolare incompleto con regioni codificanti sovrapposte.

Gli *Hepadnavirus* di origine animale, pur rivestendo scarso interesse nel mondo della medicina veterinaria, sono stati un importante modello per la conoscenza e la comprensione di HBV umano. Lo studio di questi modelli di virus animali ha portato alla luce altri fondamentali aspetti che contraddistinguono i membri di questa famiglia: la presenza di una polimerasi virale legata covalentemente al filamento negativo di DNA, la peculiare strategia replicativa mediante trascrizione inversa di un pre-genoma ad RNA, la scarsa citotossicità diretta sulle cellule epatiche infette, la produzione eccedente di particelle subvirali non infettive in corso di infezione e la capacità di instaurare infezioni persistenti<sup>13</sup>.

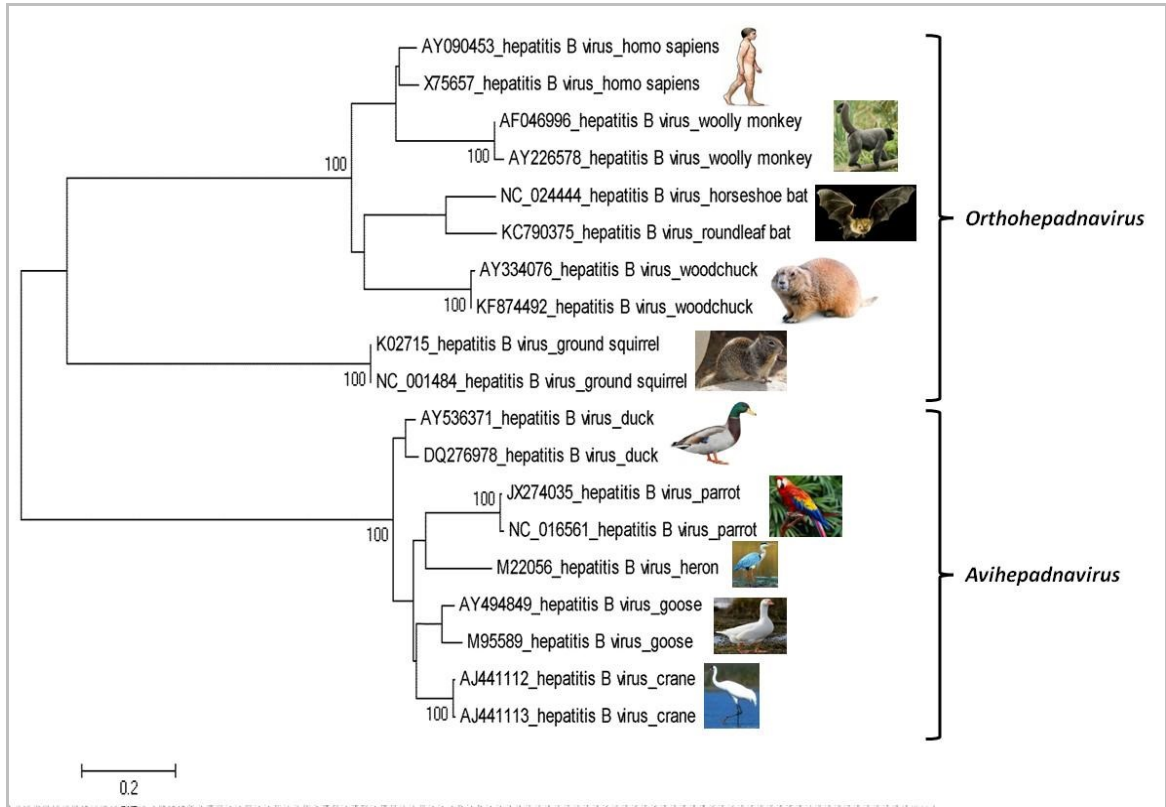


Figura 3: Albero filogenetico della famiglia Hepadnaviridae.

## Struttura del virione

A partire dal 1970, grazie a studi di microscopia elettronica è stato possibile definire la struttura del virus dell'epatite B.

Il virione infettivo di HBV, denominato particella di Dane dal nome del suo scopritore, è una struttura sferica a doppio contorno di dimensioni comprese tra 42 e 47 nm di diametro<sup>5</sup> (Figura 4).

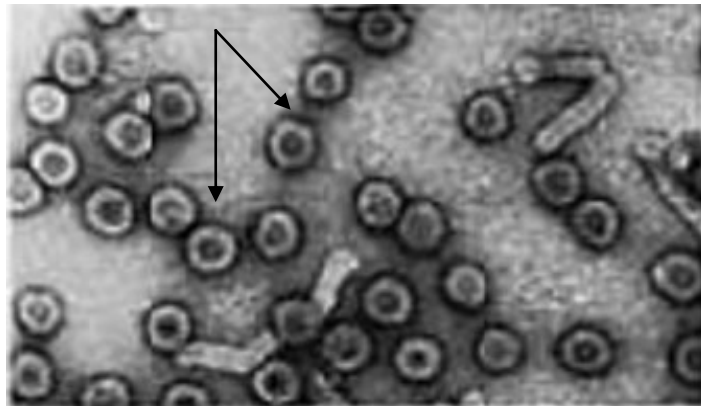


Figura 4: Particelle di Dane al microscopio elettronico.

La particella di Dane è costituita da 2 elementi<sup>14</sup> (Figura 5) che, dall'interno all'esterno del virione, sono:

- *nucleocapside o core*
- *envelope*

Il *nucleocapside* costituisce la struttura più interna della particella di Dane, presenta simmetria icosaedrica e dimensione di 25-27 nm di diametro. Si tratta di una struttura proteica costituita da copie multiple di una proteina detta antigene del core (HBcAg) prodotta a livello del citosol della cellula ospite durante il ciclo replicativo virale. La struttura proteica icosaedrica costituita da HBcAg racchiude la porzione centrale della particella di Dane contenente il genoma virale (molecola di DNA a doppia elica circolare) ed un enzima fondamentale per la replicazione del patogeno (DNA polimerasi virale)<sup>7,15</sup>.

L'*envelope* è l'involucro lipoproteico esterno della particella di Dane, costituito da una piccola componente lipidica di origine cellulare e da tre tipi di glicoproteine di superficie (HBs) sintetizzate ed assemblate a livello della membrana del reticolo endoplasmatico cellulare dell'ospite. Le proteine che costituiscono l'*envelope* sono legate tra loro da ponti disolfuro in modo da formare omo- ed etero-dimeri. Queste proteine rappresentano la componente antigenica superficiale del virus dell'epatite B ed in base alla loro lunghezza sono definite small (SHBs), medium (MHBs) e large (LHBs)<sup>5,16,17</sup>.

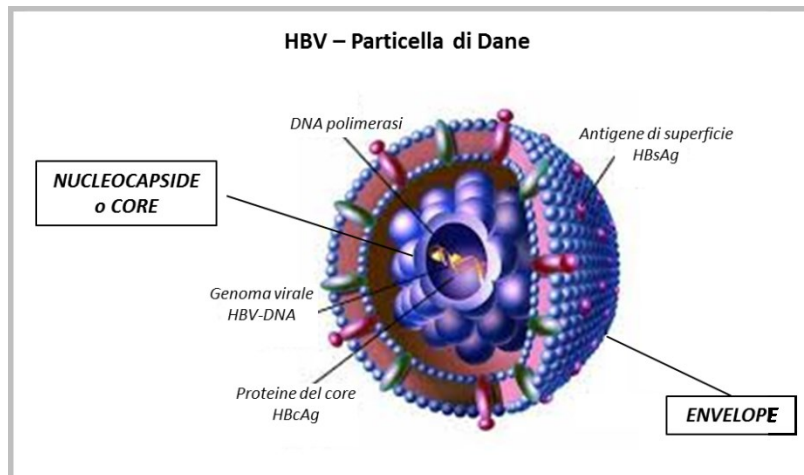


Figura 5: Struttura tridimensionale della particella di Dane.

Il numero di particelle di Dane presenti nel siero di un soggetto infetto è molto variabile e dipende dal tipo di infezione: si possono rilevare meno di  $10^2$  particelle/ml di siero in caso di infezioni occulte ed asintomatiche, mentre si possono avere più di  $10^8$  particelle/ml di siero durante la fase di attiva replicazione virale di un'infezione acuta o cronica.

Oltre alle particelle di Dane, in un soggetto infetto sono presenti in circolo altri due tipi di particelle virali: le *sferule* ed i *tubuli* (Figura 6).

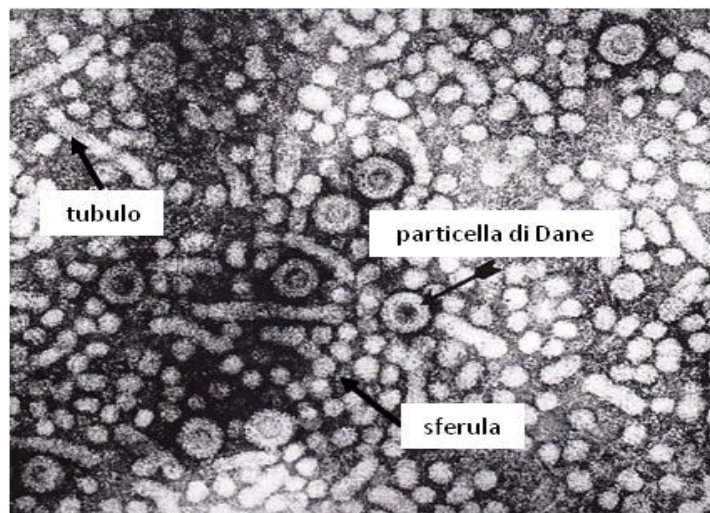


Figura 6: Particelle di Dane, sferule e tubuli al microscopio elettronico.



Le *sferule* hanno struttura sferica di 20 nm di diametro; sono le particelle virali più numerose in corso di infezione, infatti possono essere prodotte 1000 volte in più rispetto alle particelle di Dane e raggiungere le  $10^{13}$  particelle/ml di siero.

I *tubuli* sono filamenti di 20 nm di diametro e lunghezza variabile; sono prodotti in eccesso rispetto alle particelle di Dane ma sono meno numerosi delle sferule tanto da raggiungere un massimo di  $10^{11}$  particelle/ml di siero.

Sia le sferule che i tubuli sono costituiti dalle glicoproteine di superficie virali altamente immunogene (HBs) prodotte in eccesso nel corso dell'infezione; tuttavia, rispetto alle particelle di Dane, sono strutture virali difettive poiché mancano del nucleocapside con l'acido nucleico virale e la polimerasi (Figura 7). Queste particelle virali seguono il naturale ciclo vitale dei virioni maturi, senza però dare origine ad un ciclo replicativo e quindi ad un'infezione<sup>17-19</sup>.

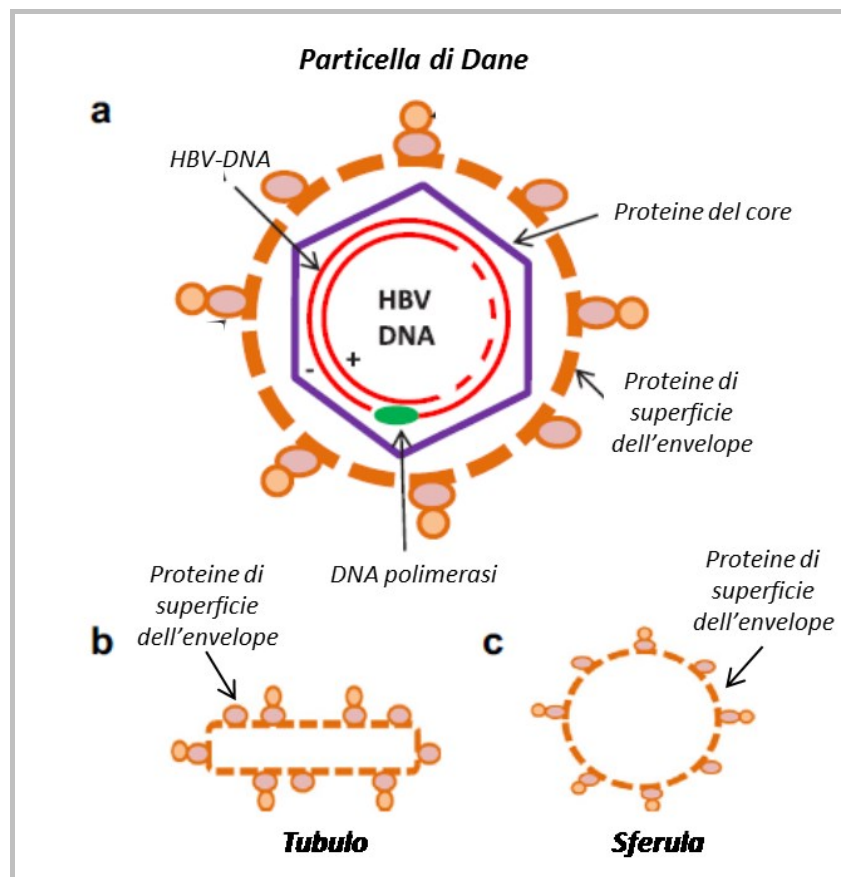


Figura 7: Struttura schematizzata di una particella di Dane (a), di un tubulo (b) e di una sferula (c) di HBV.

## Struttura del genoma virale

La struttura e l'organizzazione del genoma del virus dell'epatite B sono state descritte tra la fine degli anni '70 e l'inizio degli anni '80, quando per la prima volta è stato possibile clonare il genoma virale di HBV e successivamente sequenziarlo<sup>6,7,20</sup>.

La particella di Dane racchiude nella sua porzione centrale una molecola di DNA circolare e rilassata (rcDNA) a doppio filamento con lunghezza complessiva di circa 3200 nucleotidi e peso molecolare di 2.1 kDa. La doppia elica di HBV-DNA possiede una caratteristica peculiare, ovvero è incompleta: un filamento risulta più lungo dell'altro, in particolare il filamento a polarità negativa L(-) è completo, mentre il filamento a polarità positiva S(+) è incompleto ed è lungo solo il 50-80% rispetto al filamento L(-). Tuttavia, in corso di replicazione virale la presenza di DNA polimerasi endogena permette la riparazione del filamento a polarità positiva trasformando il DNA di HBV in una molecola circolare a doppia elica completa, covalentemente chiusa e superavvolta (cccDNA)<sup>21</sup>.

All'interno della particella di Dane, la struttura circolare dell'acido nucleico viene mantenuta tale dall'appaiamento non covalente di circa 260 nucleotidi all'estremità 5' delle due catene del genoma virale. Entrambe le estremità 5' della doppia elica di HBV presentano dei legami con altri elementi: l'estremità 5' del filamento L(-) possiede una piccola ridondanza ed è legata covalentemente alla porzione N-terminale della DNA polimerasi virale, mentre l'estremità 5' del filamento S(+) è legata ad una sequenza oligonucleotidica di 18 bp di RNA pre-genomico rivestito in posizione 5', il quale funge da innesco per la polimerasi virale per completare la sintesi di S(+) durante il ciclo replicativo<sup>22-24</sup> (Figura 8).

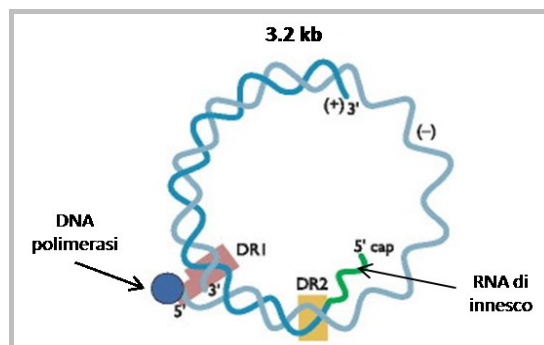


Figura 8: Molecola di HBV-DNA.

Il genoma di HBV è molto compatto e strutturalmente complesso, caratterizzato dalla presenza sia di regioni codificanti sia di sequenze ripetute e regolatorie.

Per quanto riguarda le regioni codificanti, l'HBV-DNA è costituito da 4 *Open Reading Frame* (ORFs) ampiamente sovrapposte tra di loro in modo tale che da un genoma di dimensioni limitate, a partire da differenti siti di inizio trascrizione (codoni di start AUG), è possibile la sintesi di 7 diverse proteine virali ognuna delle quali possiede una specifica struttura e funzione. Le 4 ORFs di HBV si suddividono in due regioni codificanti per proteine strutturali dell'envelope (ORF pre-S/S) e del core (ORF pre-

C/C), mentre le altre due regioni codificano per proteine funzionali (ORF X e ORF P). Tutti i nucleotidi del genoma virale di HBV appartengono ad una ORF e tutte le ORFs sono almeno in parte sovrapposte l'una all'altra. L'ORF di maggiore lunghezza è l'ORF P, che si estende per quasi tutto il genoma virale. L'ORF pre-S/S è completamente compresa all'interno dell'ORF P, mentre l'ORF X e l'ORF pre-C/C si sovrappongono parzialmente tra di loro ed all'ORF P<sup>18,25,26</sup> (Figure 9 e 10).

Oltre alle regioni codificanti, il genoma di HBV presenta alcune sequenze ripetute e diverse sequenze regolatorie comprese tra i nucleotidi delle varie ORF e coinvolte nel ciclo replicativo virale.

In prossimità delle estremità del filamento a polarità negativa di HBV-DNA vi sono due brevi *elementi ripetuti* (DR1 e DR2) costituiti da circa 11 nucleotidi ciascuno e cruciali nella strategia di replicazione virale. In particolare, la sequenza DR2 è il sito di inizio per la sintesi del filamento a polarità positiva del genoma di HBV<sup>23,24,27,28</sup> (Figura 9).

Per quanto riguarda le sequenze regolatorie, si possono distinguere *quattro promotori e due enhancer* (Enh1 e Enh2) sovrapposti alle ORFs del genoma virale.

I quattro promotori costituiscono il sito di aggancio per l'enzima RNA polimerasi II della cellula ospite al fine di avviare la trascrizione di 4 RNA messaggeri (mRNA) che, attraverso, l'uso di differenti codoni di start, permettono l'espressione delle 7 proteine virali<sup>18,26</sup>. I quattro promotori di HBV-DNA sono:

- *promotore pre-S1*, localizzato all'interno dell'ORF P, è regolato da almeno due fattori trascrizionali epatici (HNF-1 e HNF3) e permette la sintesi di un mRNA genomico di 2.4 kb poco abbondante nelle cellule epatiche infette<sup>29,30</sup>;
- *promotore pre-S2/S*, localizzato nella porzione del genoma virale in cui l'ORF pre-S/S si sovrappone all'ORF P, è uno dei più attivi promotori di HBV che permette la sintesi di un mRNA di 2.1 kb i cui prodotti proteici sono essenziali per l'assemblaggio ed il rilascio dalla cellula ospite dei nuovi virioni durante il ciclo replicativo<sup>31</sup>;
- *promotore pre-C/C*, anche conosciuto come promotore della regione pre-core (basal core promoter o BCP), è in grado di legare diversi fattori trascrizionali epatici (come C/EBP, HNF-3 e HNF4) e permettere la sintesi di due tipi di mRNA di circa 3.5 kb, un RNA pre-genomico più corto che costituisce il template per la trascrizione inversa e la produzione delle proteine virali Core e P ed un mRNA pre-C/C più lungo che permette la traduzione di un peptide segnale pre-core/core<sup>32</sup>;
- *promotore X*, localizzato nell'ORF P, permette la trascrizione di un mRNA di 0.7 kb a seguito di legame con il fattore di trascrizione cellulare X-PBP<sup>33</sup>.

Tutti gli mRNA prodotti dall'acido nucleico di HBV hanno orientamento positivo, sono rivestiti all'estremità 5' e poliadenilati al 3' (Figura 9).

I due enhancer, Enh1 ed Enh2, sono sequenze specifiche di HBV-DNA che aumentano la frequenza di trascrizione del genoma virale<sup>34</sup>. L'enhancer Enh1 è una sequenza nucleotidica di circa 200 bp

compresa tra le posizioni 1074 e 1234 nt, risulta quindi localizzato nella porzione del gene P compresa tra le ORF preS/S ed X<sup>35</sup>. Questo enhancer stimola tutti i promotori di HBV-DNA favorendo la trascrizione di tutti gli mRNA virali, tuttavia regola in maniera significativa il promotore X al quale è più prossimo. Diversi elementi cellulari, sia epatici sia ubiquitari, sono in grado di legare Enh1. L'attività di Enh1 è modulata dai glucorticoidi attraverso l'interazione tra l'enhancer stesso ed un altro fattore regolatorio di HBV (GRE) localizzato a monte di Enh1<sup>18,26</sup>. L'enhancer Enh2 si sovrappone al promotore pre-C/C, in particolare si trova all'interno del gene X, a valle di Enh1 ma immediatamente a monte dell'ORF pre-C/C<sup>36</sup>. Enh2 è costituito da due elementi interattivi, box  $\alpha$  e box  $\beta$ , che vengono legati da specifici fattori epatici necessari per l'attività dell'enhancer. Anche Enh2 promuove la trascrizione dei 4 mRNA di HBV, ma la sua attività risulta meno potente di quella di Enh1<sup>18,26</sup>.

Altri elementi regolatori identificati sul genoma di HBV sono<sup>18,26</sup>:

- *Elemento reattivo glucorticoide (GRE)*, localizzato tra i due enhancer Enh1 ed Enh2 nella porzione di HBV-DNA in cui l'ORF P si sovrappone all'ORF pre-S/S. Questo elemento regolatorio contiene due copie in tandem della sequenza nucleotidica TGTCCT. GRE non ha la funzione di enhancer, ma aumenta l'attività glucorticoide-dipendente dei due enhancer di HBV favorendo indirettamente l'aumento della trascrizione degli mRNA del patogeno e quindi la produzione delle proteine virali<sup>37</sup>;
- *Sequenza CCAAT*, localizzata a monte del promotore pre-S2/S. Questo elemento regolatorio è essenziale per l'attività del promotore pre-S2/S, mentre regola negativamente il promotore pre-S1; ne consegue un'elevata trascrizione dell'mRNA di 2.1 kb a discapito dell'mRNA genomico di 2.4 kb<sup>38</sup>;
- *Elemento regolatore negativo (NRE)*, localizzato a monte dell'enhancer Enh2, inibisce l'attività di quest'ultimo e di conseguenza la produzione di mRNA da parte del promotore pre-C/C a cui Enh2 è sovrapposto<sup>39</sup>;
- *Segnale di poliadenilazione*, localizzato a livello dell'ORF pre-C/C, si tratta di una sequenza esanucleotidica (TATAAA) essenziale per determinare la fine della trascrizione di HBV-DNA e l'aggiunta della coda poli-A all'estremità 3' delle molecole di mRNA. Tutti gli mRNA trascritti dal genoma di HBV terminano circa 20 nt a valle di tale sequenza di poliadenilazione<sup>40</sup>.

Anche sugli mRNA prodotti dal genoma di HBV sono stati individuati alcuni elementi regolatori come ad esempio<sup>18,26</sup>:

- *Segnale  $\epsilon$* , si tratta di una struttura secondaria specifica ed altamente conservata, presente all'estremità 5' dell'mRNA pre-genomico, necessaria durante il ciclo replicativo virale per permettere la sintesi di nuovo materiale genetico<sup>41</sup>;
- *Elemento regolatorio post-trascrizionale (PRE)*, si tratta di una sequenza di circa 500 nucleotidi che favorisce il trasferimento degli mRNA virali al di fuori del nucleo della cellula ospite per essere tradotti in proteine nel citosol cellulare<sup>42</sup>.

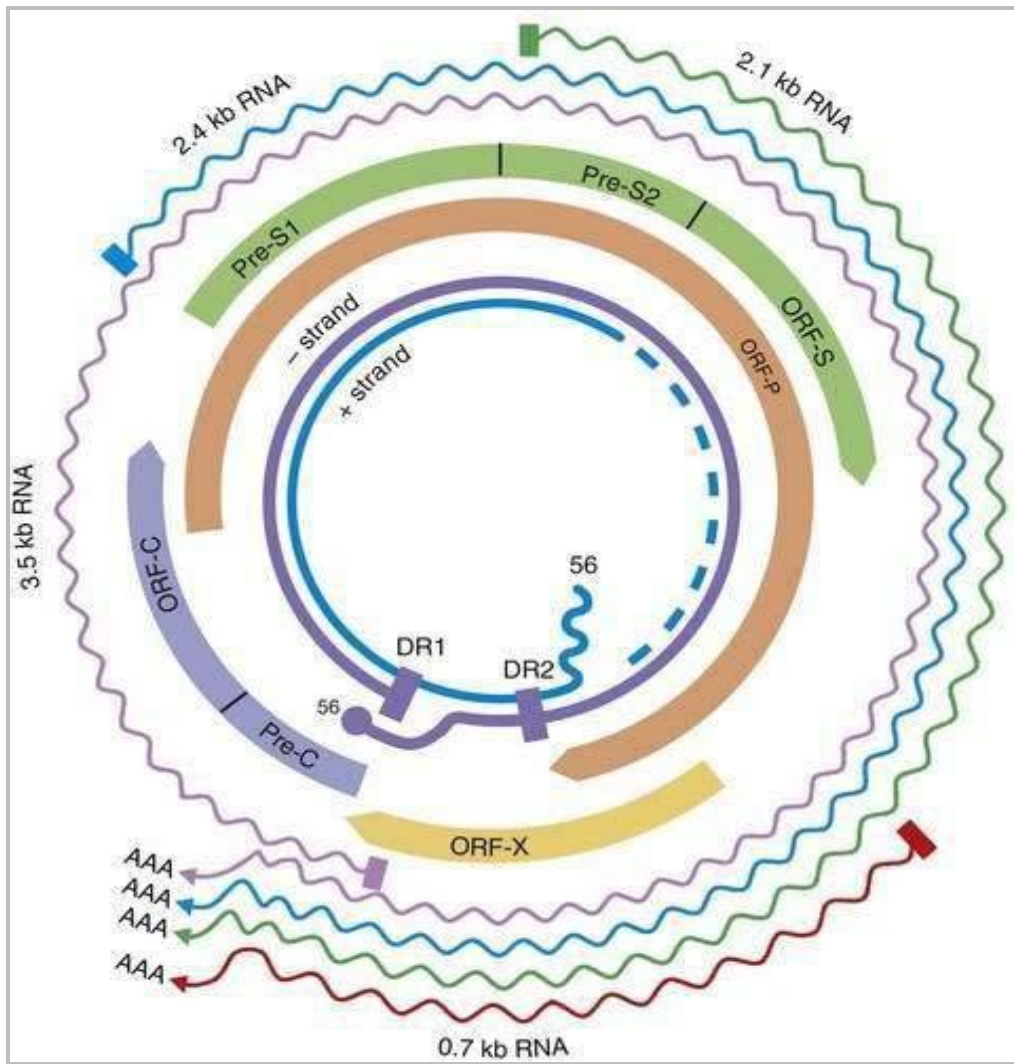


Figura 9: Struttura schematizzata del genoma virale di HBV.

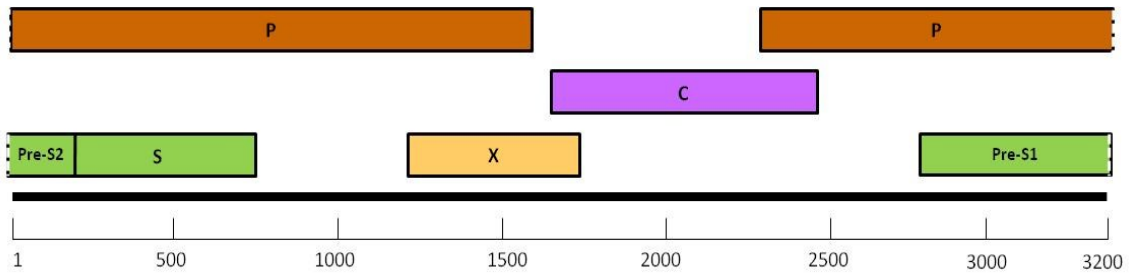


Figura 10: Rappresentazione lineare del genoma virale di HBV.

## Proteine virali

Le quattro ORFs del genoma di HBV permettono la sintesi di 7 proteine virali con specifica struttura e funzione<sup>26</sup>:

- ORF 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. Da questa regione vengono sintetizzate le *tre proteine strutturali di superficie* (small HBs, medium HBs e large HBs) che costituiscono l'envelope virale. Queste proteine presentano lunghezza differente poiché la loro sintesi inizia da tre distinti codoni di start, ma termina con un unico comune codone di stop. L'espressione di queste proteine di superficie è regolata sia a livello trascrizionale sia traduzionale<sup>43</sup>: il promotore pre-S1 permette la sintesi dell'mRNA genomico di 2.4 kb dal quale si otterrà la proteina di superficie large (LHBs), mentre il promotore pre-S2/S permette la sintesi dell'mRNA genomico di 2.1 kb che permetterà la produzione della proteina di superficie middle (MHBs) o small (SHBs) in base a quale dei due codoni di start viene attivato (Figura 11). Nel corso del ciclo replicativo virale, le tre proteine di superficie di HBV vengono stabilizzate le une alle altre da ponti disolfuro per permettere la formazione dell'envelope e vengono glicosilate da proteine transmembrana di tipo II dell'ospite<sup>17,26</sup>.

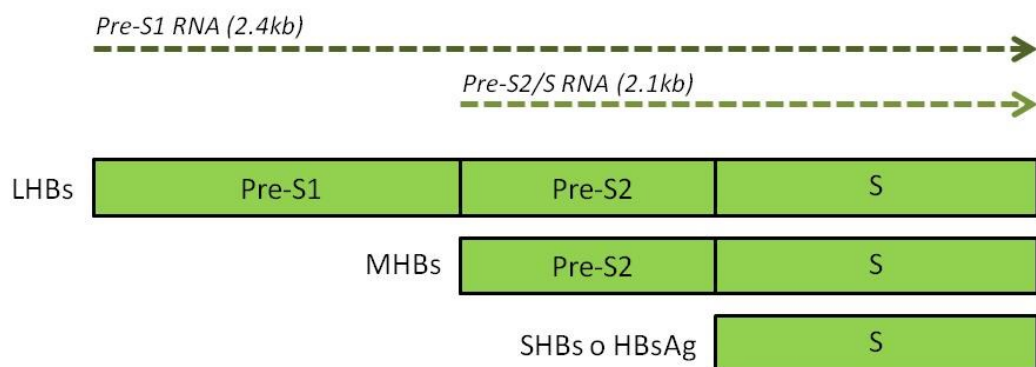


Figura 11: mRNA e proteine dell'ORF preS/S.

Il *gene S* codifica per la proteina di superficie più corta (circa 226 amminoacidi) dell'envelope virale (SHBs) che nella forma non glicosilata e monoglicosilata assume rispettivamente il nome di P25 e GP30<sup>44</sup>. Dal punto di vista quantitativo è la proteina maggiormente rappresentata sulla superficie di HBV (circa l'85% delle glicoproteine totali) e quindi viene definita *major*. Inoltre, questa proteina contiene i principali siti antigenici virali e per questo motivo viene identificata come l'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg). L'immunogenicità dell'intera proteina è legata ad una regione idrofilica (Major Hydrophilic Region o MHR), all'interno della quale si trova una struttura a due loop (uno maggiore ed uno minore), estroflessi sulla superficie virale e legati da ponti disolfuro, che comprende una

porzione ricca di residui cisteinici (amminoacidi 124-147) denominata determinante *a* (Figura 12).

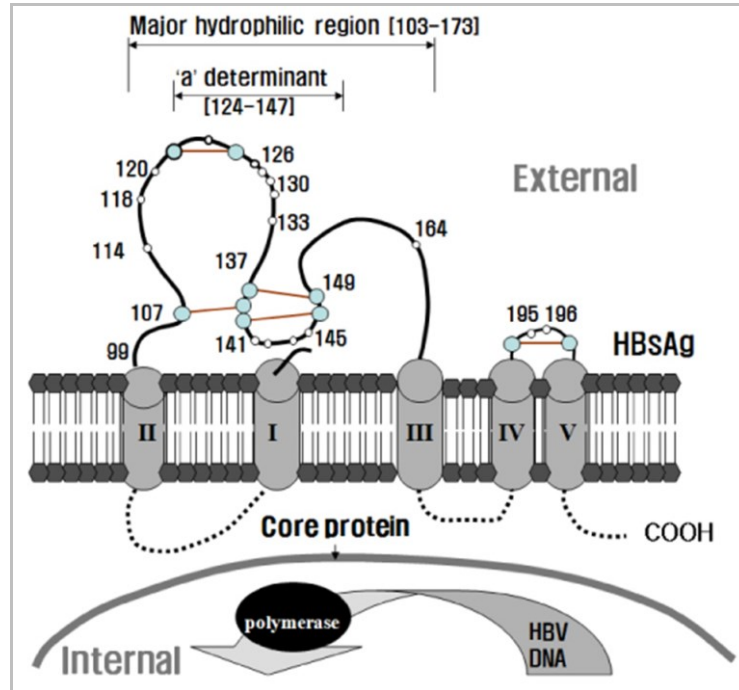


Figura 12: Major Hydrophilic Region e determinante *a* di HBsAg.

Il determinante *a* contiene i principali epitopi in grado di indurre il sistema immunitario dell'ospite a produrre specifici anticorpi anti-HBs neutralizzanti che conferiscono protezione nei confronti di un'eventuale esposizione al virus. Data l'elevata immunogenicità del determinante *a*, la proteina HBsAg costituisce il principale componente degli attuali vaccini anti-epatite B. Tuttavia, gli anticorpi anti-HBs prodotti in seguito ad immunoprofilassi attiva sono in grado di riconoscere il determinante *a* solo nella sua conformazione originale. Mutazioni a carico di questa porzione amminoacidica possono alterare la struttura terziaria dell'intera proteina tanto da non essere più riconosciuta dagli anticorpi anti-HBs neutralizzanti prodotti a seguito di vaccinazione e quindi dare inizio a nuove infezioni (breakthrough infections) sostenute da ceppi mutanti, nonostante l'ospite risulti sieroprotetto<sup>45</sup>.

Le due porzioni genomiche *pre-S1* e *pre-S2* che precedono il gene *S*, permettono rispettivamente la sintesi delle proteine large (LHBs) e medium (MHBs), che insieme a SHBs vanno a costituire l'envelope di HBV (Figura 13).

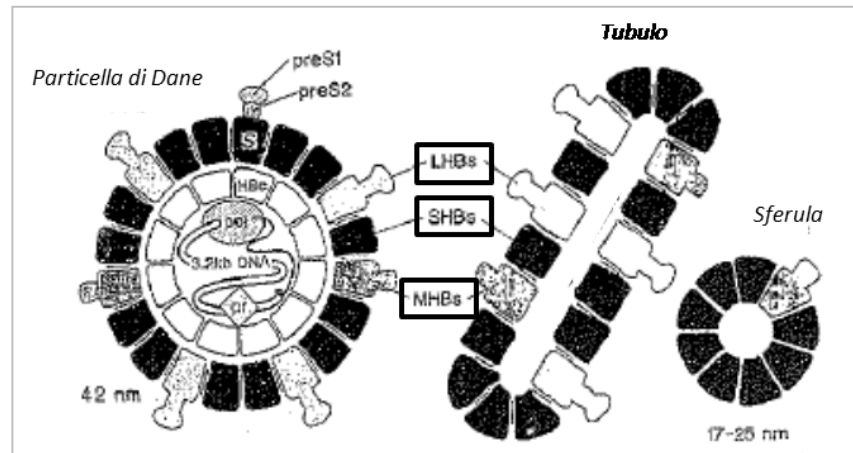


Figura 13: Proteine di superficie (HBs) di HBV codificate dalla ORF pre-S/S.

La proteina medium (detta anche pre-S2) è costituita da circa 55 amminoacidi in più rispetto ad HBsAg e viene codificata dalla regione pre-S2 e dal gene S; in forma mono e diglicosilata viene definita rispettivamente GP33 e GP36<sup>46</sup>. Invece, la proteina large (detta anche pre-S1) contiene 108-119 amminoacidi in più rispetto ad HBsAg ed è codificata dall'ORF completa (regione pre-S1, pre-S2 e gene S). LHBs viene definita P39 in forma non glicosilata, mentre GP42 in seguito a monoglicosilazione<sup>47</sup>. Entrambe queste proteine di superficie pre-S sono meno numerose a livello dell'envelope virale rispetto ad HBsAg (dal 10 al 30% delle glicoproteine totali), tuttavia contengono anch'esse epitopi per le cellule B e T del sistema immunitario<sup>48-50</sup>. Inoltre, svolgono un ruolo fondamentale nel ciclo vitale e nella morfogenesi del virus. In particolare, la proteina LHBs possiede siti di attacco in grado di legare co-recettori presenti sulle cellule epatiche favorendo la penetrazione delle particelle virali nell'epatocita, è coinvolta nell'assemblaggio dei nuovi virioni interagendo con le proteine del nucleocapside e contribuisce al rilascio delle particelle virali mature dalla cellula ospite<sup>51</sup>.

#### - ORF pre-C/C

La regione pre-C/C comprende il gene C preceduto da una breve porzione nucleotidica denominata pre-C. Questa regione è costituita da 2 codoni di start che identificano rispettivamente il gene C e l'intera ORF (regione pre-C insieme al gene C). Le proteine dell'ORF pre-C/C sono HBe e HBe, tradotte rispettivamente dall'mRNA pre-genomica e dall'mRNA pre-C/C di 3.5kb, i quali vengono sintetizzati grazie al promotore pre-C/C<sup>26</sup> (Figura 14).

Il gene C codifica per la proteina del core (HBe), maggiore componente strutturale del nucleocapside virale. HBe possiede due domini, una porzione di circa 150 amminoacidi necessaria per la formazione del capside virale ed un dominio C-terminale, costituito da 35 residui amminoacidici, ricco in arginine. Questo dominio C-terminale svolge un ruolo importante nella replicazione virale poiché le arginine che lo compongono hanno un'elevata



affinità per l'RNA, quindi favoriscono l'incapsidamento dell'RNA pre-genomico nella particella del core per permettere la sintesi di nuovo DNA virale<sup>52</sup>. Inoltre, HBc possiede diverse lisine fosforilate attraverso una modificazione post-traduzionale che rappresenta un importante passaggio nella maturazione del virione per la sua successiva fuoriuscita dalla cellula ospite<sup>17,53</sup>.

Dalla trascrizione del gene C e della regione pre-C deriva la proteina di secrezione HBe. L'ORF preC/C codifica inizialmente per un peptide segnale pre-core/core che dal citoplasma passa all'interno del reticolo endoplasmatico della cellula ospite. Durante questo passaggio 19 amminoacidi dell'estremità N-terminale della proteina pre-core/core vengono rimossi. Successivamente la proteina viene trasportata all'interno del compartimento del Golgi dove una proteasi rimuove altri 34 amminoacidi all'estremità C-terminale permettendo la formazione della proteina HBe<sup>54</sup>. Questa proteina non svolge nessuna funzione strutturale; in piccola quantità viene espressa sulla superficie virale insieme all'HBsAg diventando un importante bersaglio della risposta immune dell'ospite che distrugge la cellula infetta<sup>55</sup>, ma principalmente viene sintetizzata e secreta nel siero dei soggetti infetti, risultando un marcatore di attiva replicazione virale ed infettività<sup>56</sup>.

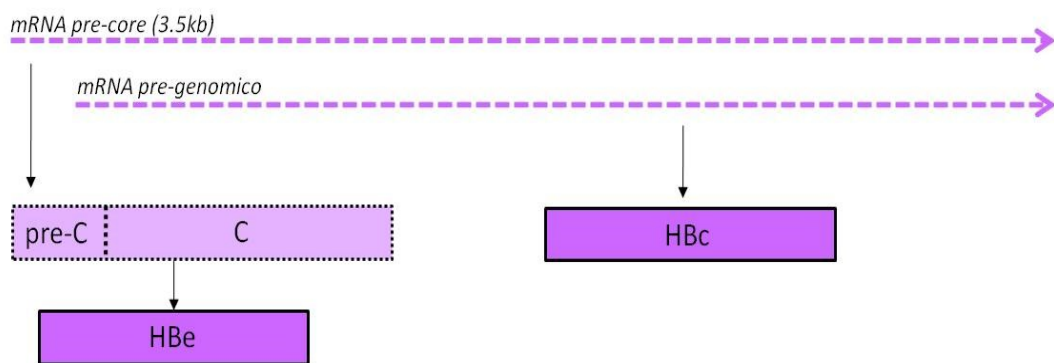


Figura 14: mRNA e proteine dell'ORF pre-C/C.

#### - ORF P

Il gene P si estende per quasi tutto il genoma di HBV (80% del totale) includendo parte di tutti gli altri geni<sup>26</sup>. Dal gene P, mediante il trascritto pre-genomico sintetizzato dal promotore pre-C/C, vengono prodotti enzimi essenziali al ciclo replicativo virale<sup>57</sup>.

Nello specifico, questo gene esprime una poliproteina (circa 94 kDa) costituita da 4 domini<sup>58</sup> (Figura 15):

- a. dominio TP (terminal protein) o primasi, localizzato all'estremità N-terminale della poliproteina, lega l'RNA pre-genomico all'estremità 5' ed è coinvolto nella replicazione del genoma virale<sup>59</sup>;

- b. dominio spacer, localizzato subito dopo il dominio TP, di cui al momento non se ne conosce l'esatta funzione;
- c. dominio polimerasi (Pol/RT), costituito al suo interno da 7 sotto-domini (A-G), corrisponde alla DNA polimerasi virale con funzione di trascrittasi inversa che utilizzando come stampo il filamento L(-) di HBV-DNA ne permette la retro-trascrizione e la formazione dell'ibrido DNA-RNA;
- d. dominio RNasi-H, collocato all'estremità C-terminale della poliproteina, è una ribonucleasi H che esplicando la sua attività proteolitica nei confronti dell'ibrido precedentemente formato permette la sintesi del filamento incompleto S(+) del genoma virale<sup>60</sup>.

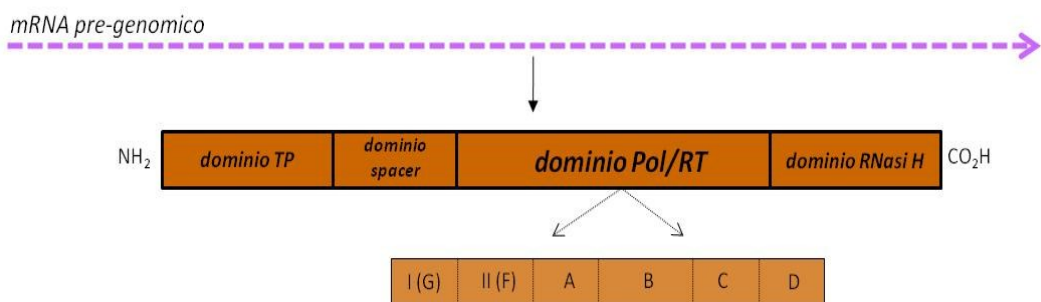


Figura 15: mRNA e proteina dell'ORF P.

- ORF X

Il gene X codifica per una proteina non strutturale di 154 amminoacidi (HBx) mediante l'mRNA genomico di 0.7 kb trascritto dal promotore X<sup>26</sup> (Figura 16).

Il ruolo di questa proteina in corso di infezione è ancora incerto. Studi in vitro ed in vivo hanno dimostrato che la proteina X, aumentando l'attività di enhancer e promotori, ha una funzione trans-attivante regolando in maniera diretta ed indiretta l'espressione genica virale e cellulare. Inoltre, HBx è in grado di formare complessi con diverse proteine, come segnali di trasduzione e regolatori della crescita e della sopravvivenza cellulare, alterandone i normali pathway. La proteina X sembra quindi svolgere un ruolo centrale nella patogenesi di HBV, in particolare sembra promuovere le infezioni croniche, favorire la comparsa e la persistenza di fibrosi e cirrosi (condizioni che precedono l'epatocarcinoma) e contribuire al rimodellamento della matrice extra-cellulare durante la progressione tumorale<sup>61-65</sup>.

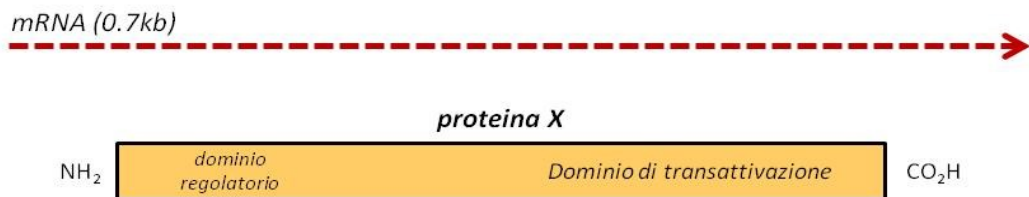


Figura 16: mRNA e proteina dell'ORF X.

## Ciclo replicativo

Il virus dell'epatite B ha sviluppato un meccanismo di replicazione che presenta due importanti peculiarità: riduce al minimo la citotossicità diretta sulla cellula infetta e replica mediante trascrittasi inversa con formazione di un intermedio ad RNA che lo fa assomigliare ad un Retrovirus.

HBV è un agente patogeno altamente epatotropo; gli epatociti sono considerati il bersaglio primario di infezione e sono le uniche cellule all'interno delle quali è in grado di replicare<sup>13,66</sup>.

Il ciclo replicativo di HBV in una cellula epatica vulnerabile può essere schematizzato in 5 principali fasi (Figura 17):

- adesione ed ingresso del virus nella cellula ospite
- svestimento
- sintesi di nuovo materiale genetico
- assemblaggio di nuovi virioni
- fuoriuscita dei nuovi virioni dalla cellula infettata<sup>67-69</sup>.

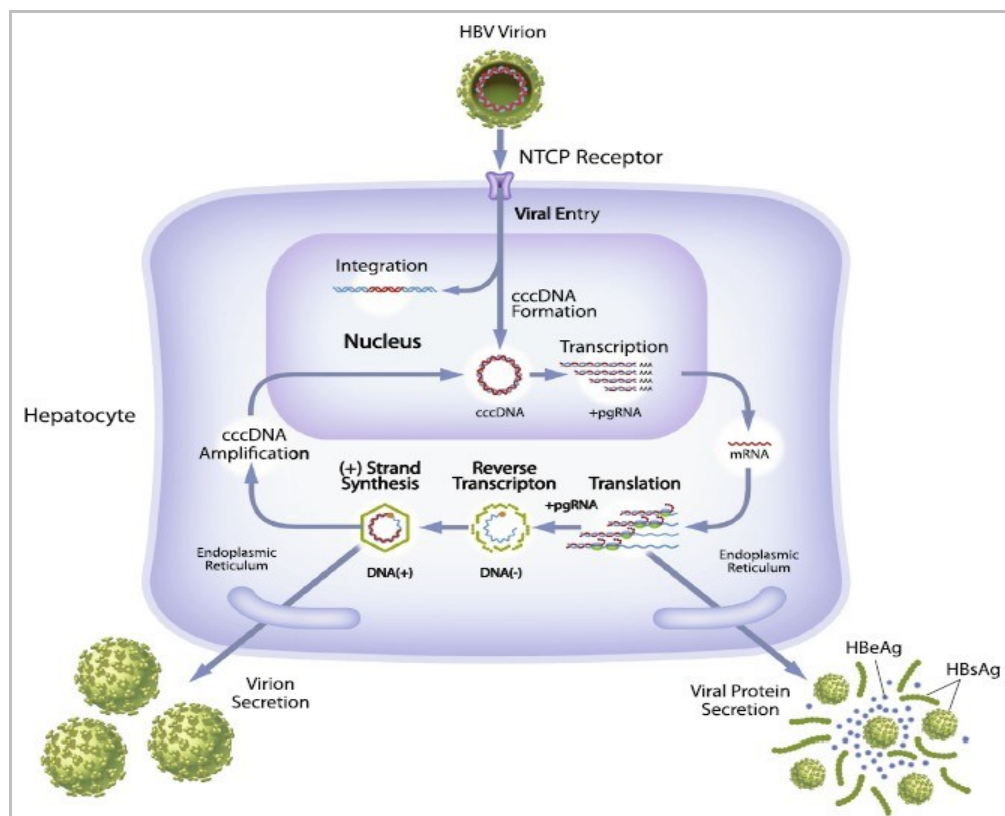


Figura 17: Ciclo replicativo virale.

Da diverso tempo è stato ipotizzato che l'ingresso di HBV nell'epatocita avvenisse tramite recettori e co-recettori localizzati sulla membrana della cellula epatica. Solo più recentemente è stato però scoperto che l'effettivo ingresso in cellula di HBV avviene per mezzo di un trasportatore epatico degli acidi biliari localizzato sulla membrana sinusoidale dell'epatocita, il recettore polipeptide co-trasportatore del sodio-taurocolato (NTCP). Tuttavia, un ruolo fondamentale nell'adesione della particella virale all'epatocita, per permetterne il successivo ingresso, viene svolto dalla proteina di superficie pre-S1 di HBV, in grado di legare sia co-recettori sulla superficie della cellula ospite sia lo stesso recettore NTCP<sup>70-72</sup>.

Nel citoplasma della cellula ospite, HBV perde la propria identità morfologica con il processo di svestimento, in cui il rivestimento virale più esterno viene demolito, mentre la particella del core passa nel nucleo cellulare attraverso il sistema di trasporto microtubulare dei pori del nucleo. Qui, anche la particella del core viene demolita permettendo il rilascio dell'HBV-DNA legato alla polimerasi virale<sup>73</sup>.

Nel nucleo dell'epatocita, il DNA virale circolare e rilassato (rcDNA) viene convertito nella forma circolare chiusa covalente (cccDNA) grazie all'attività della DNA polimerasi endogena che completa il filamento a polarità positiva di HBV<sup>13,16,21</sup>.

Il cccDNA viene quindi utilizzato come template dall'enzima RNA polimerasi II dell'ospite al fine di produrre un trascritto pre-genomico (pgRNA) e tre RNA genomici. Nel reticolo endoplasmatico dell'epatocita, gli RNA genomici (2.4, 2.1 e 0.7 kb) vengono tradotti nelle tre proteine di superficie (pre-S1, pre-S2 e HBs) che costituiscono l'envelope virale e nella proteina X, invece nel citoplasma il pgRNA (3.5 kb) permette la produzione delle proteine del core (HBc e HBe) e della polimerasi<sup>74-76</sup>.

L'RNA pre-genomico viene anche utilizzato come stampo per la sintesi di nuove molecole di DNA virale in quanto è l'unico trascritto di HBV che permette la replicazione genomica. In particolare, nel citosol della cellula ospite le proteine HBc si assemblano formando il nucleocapside ed una molecola di pgRNA, insieme alla polimerasi virale, viene incapsidata all'interno del core virale appena assemblato. Solo le molecole di RNA pre-genomico possono essere incorporate nel nucleocapside poiché, a differenza degli RNA genomici, pgRNA presenta all'estremità 5' una struttura secondaria specifica, chiamata "epsilon" ( $\epsilon$ ), che funge da sito di riconoscimento per l'incorporazione nel core virale<sup>41,77</sup>. Dopo che pgRNA viene incapsidato, la DNA polimerasi virale inizia la sintesi dei due filamenti genomici in maniera sequenziale. La catena negativa viene sintetizzata per trascrizione inversa utilizzando come stampo pgRNA il quale progressivamente viene degradato dall'attività ribonucleasica di RNasi H, fatta eccezione per una breve sequenza oligonucleotidica che funge da innesco per la sintesi della complementare catena positiva la quale viene prodotta utilizzando come template il filamento negativo di nuova sintesi<sup>24,66</sup>.

La particella del core che contiene la nuova molecola di HBV-DNA può, quindi, seguire due strade: può essere riportata all'interno del nucleo dell'epatocita per formare nuovo cccDNA e dare origine ad un nuovo ciclo replicativo oppure può interagire con le proteine di superficie codificate dal gene S per la formazione dell'envelope virale. Il virione completo viene quindi escretato dalla cellula ospite e può andare ad infettare nuove cellule epatiche suscettibili<sup>67-69</sup>.

Tutti i passaggi del ciclo replicativo di HBV sono dei potenziali target per la terapia anti-virale<sup>78</sup>.

Durante il processo replicativo di HBV, è possibile la formazione di molecole di DNA virale lineare a doppio filamento. Queste sequenze nucleotidiche vengono generalmente integrate all'interno del genoma dell'ospite. L'integrazione non avviene in siti specifici e non svolge nessun ruolo essenziale nel ciclo vitale del patogeno; tuttavia, in base al sito di integrazione, tale processo può portare all'attivazione e/o all'alterazione di particolari geni implicati nel controllo e nella regolazione del ciclo cellulare, rappresentando perciò un potenziale meccanismo patogenetico nella carcinogenesi epatica HBV-correlata<sup>67,69</sup>.

## **Proprietà chimico-fisiche e caratteristiche biologiche**

### **Proprietà chimico-fisiche**

La stabilità del virus dell'epatite B non sempre coincide con quella dell'antigene di superficie (HBsAg).

Studi condotti su HBsAg ricombinante, che costituisce il componente principale degli attuali vaccini anti-epatite B, hanno dimostrato una stabilità della composizione peptidica della proteina fino a 6 mesi se conservata a -20°C e 4°C. L'immunogenicità dell'antigene viene preservata per almeno 2.5 anni se conservato a 4°C e per 2-4 settimane a 25°C e 37°C, mentre risultano causa di totale perdita di immunogenicità il congelamento e scongelamento<sup>79</sup>.

Per quanto riguarda il virione, l'esposizione ad ambienti acidi (pH 2.4 per almeno 6 ore) ed alle alte temperature (98°C per 1 minuto o 60°C per 10 ore) non porta ad una perdita di immunogenicità; tuttavia a queste condizioni si verifica una parziale inattivazione se la carica virale risulta essere molto elevata.

L'immunogenicità, e probabilmente l'infettività, vengono eliminate a seguito dell'esposizione di HBsAg allo 0.25% di ipoclorito di sodio per almeno 3 minuti. L'infettività viene completamente persa in seguito ad autoclavaggio a 121°C per 20 minuti o trattamento con calore secco a 160°C per 1 ora.

Ulteriori studi hanno dimostrato che HBV viene inattivato se esposto ad ipoclorito di sodio (500 mg di cloro per litro) per 10 minuti, glutaraldeide acquosa (0.1%, 1% e 2%) a temperatura ambiente (circa 24°C) per 5 minuti, trattamento con calore a 98°C per 2 minuti, formaldeide (18.5g/l), alcool isopropilico (70%) o alcool etilico (80%) a 11°C per 2 minuti oppure combinazione di  $\beta$ -proprilattone e radiazione UV.

Il virus dell'epatite B mantiene, invece, l'infettività se conservato a 30-32°C per almeno 6 mesi oppure congelato a -15°C per 15 anni<sup>80-82</sup>.

Le particelle virali presenti nel sangue di un soggetto infetto possono sopravvivere all'esterno del corpo umano per almeno 7 giorni e durante questo periodo il patogeno può essere causa di nuove infezioni se contagia soggetti suscettibili<sup>2</sup>.

### **Caratteristiche biologiche**

L'elevato tropismo tissutale ed il ristretto spettro d'ospite rendono difficoltoso lo studio del virus dell'epatite B umano data la scarsa presenza di adeguati modelli sperimentali.

Gli attuali sistemi in vitro includono colture primarie di epatociti umani e cellule HepaRG differenziate. Le linee cellulari epatiche transfettate con HBV permettono studi sulla replicazione virale, sull'assemblaggio ed il rilascio dei virioni.

Gli studi condotti in vitro su colture cellulari, oltre ad essere complessi, richiedono in seguito conferme in vivo in quanto le risposte cellulari possono essere differenti. Tra i sistemi in vivo, lo scimpanzé è l'unico animale completamente suscettibile all'infezione da HBV, ma altrettanto difficoltoso da impiegare come modello da laboratorio. Il topo non è permissivo, tuttavia negli ultimi anni diversi modelli di topo con fegato "umanizzato" (che presenta gli stessi recettori di superficie del fegato dell'uomo) sono stati generati per permettere studi sull'immunopatogenesi HBV-correlata<sup>83</sup>.

## Variabilità genetica

Rispetto ad altri virus a DNA, il virus dell'epatite B ha un'elevata variabilità genetica legata all'assenza di attività *proofreading* della DNA polimerasi virale ed all'uso di un intermedio a RNA (pgRNA) durante il ciclo replicativo. Entrambi questi fattori aumentano la probabilità di introdurre errori casuali nell'acido nucleico virale durante la replicazione portando ad un'evoluzione genomica<sup>84-87</sup>. È stato stimato che il tasso di sostituzioni nucleotidiche nel genoma di HBV è molto elevato, variabile in base alla porzione genomica considerata ma complessivamente compreso tra  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$  per sito per anno, ovvero valori circa 10 volte superiori rispetto ad altri virus a DNA e simili a quelli di virus a RNA<sup>88-93</sup>.

Inoltre, la presenza nel genoma virale di ORFs sovrapposte fa sì che mutazioni vantaggiose per un gene possano produrre alterazioni svantaggiose o letali nel gene sovrapposto. Per questo motivo la maggior parte delle mutazioni di HBV sono di tipo silente o sinonimo ed in generale in tutte le ORFs la frequenza di tali mutazioni è molto più elevata di quella di mutazioni non sinonime<sup>86,87,94-97</sup>.

Tuttavia, il tasso di evoluzione e di insorgenza di mutanti per HBV varia notevolmente in base al contesto clinico ed alla pressione selettiva esercitata dal sistema immunitario dell'ospite, dall'immunoprofilassi o da fattori esogeni come un'eventuale terapia anti-virale. È stato dimostrato che la frequenza di mutazioni nei soggetti immunodepressi è fino a 100 volte più elevata rispetto a quella dei soggetti con infezione da HBV silente o occulta. Le mutazioni che emergono sotto lo stimolo di diverse pressioni esterne, qualora vantaggiose, vengono fissate nel genoma virale, altrimenti, se svantaggiose, vengono eliminate durante i vari cicli replicativi<sup>86,87</sup>.

La variabilità genomica di HBV può essere suddivisa in due tipologie: variazioni genomiche casuali che portano alla formazione di diversi genotipi/sottotipi virali (rispettivamente, variazioni inter- ed intra-genotipiche) oppure mutazioni random che portano all'insorgenza di varianti o mutanti virali.

### Genotipi e sottotipi

I genotipi ed i sottotipi di HBV derivano da sostituzioni nucleotidiche casuali all'interno del genoma virale che sono insorte sotto pressione selettiva esterna e, nel corso del tempo, si sono stabilizzate in una determinata popolazione. Questi ceppi circolano stabilmente e parallelamente ai ceppi originali all'interno della popolazione nella quale si sono evoluti.



Originariamente, il virus dell'epatite B umano è stato classificato in sierotipi in base all'eterogeneità dell'antigene di superficie (HBsAg). Il determinante  $\alpha$  è un determinante antigenico di gruppo, comune a tutti i ceppi virali, ma all'interno del quale si trovano due determinanti mutualmente esclusivi, denominati d/y e w/r, localizzati rispettivamente in posizione 122 e 160 della sequenza amminoacidica di HBsAg<sup>98-100</sup>. La presenza di questi determinanti ha permesso di individuare 4 sierotipi principali: adw, adr, ayw, ayr. La loro diffusione è eterogenea, i primi tre sono più frequenti, il quarto si rileva più raramente. Una classificazione più scrupolosa suddivide HBV in 10 sierotipi (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw3, adw4q-, adwq- ed adwq+) in base alla variabilità amminoacidica nelle posizioni 127, 134/159, 177 e 178 di HBsAg<sup>101,102</sup> (Tabella 1).

Serotype	HBsAg sequence
<i>ayw1</i>	122R + 160K + 127P + (134F and/or 159A)
<i>ayw2</i>	122R + 160K + 127P
<i>ayw3</i>	122R + 160K + 127T
<i>ayw4</i>	122R + 160K + 127L
<i>ayr</i>	122R + 160R
<i>adw2</i>	122K + 160K + 127P
<i>adw3</i>	122K + 160K + 127T
<i>adw4q-</i>	122K + 160K + 127L + 178Q
<i>adrq+</i>	122K + 160R + 177V + 178P
<i>adrq-</i>	122K + 160R + 177A

Tabella 1: Variabilità sierotipica di HBV.

Oggi giorno, l'analisi filogenetica di genomi completi di HBV umano, sequenziati e pubblicati da vari scienziati nel corso del tempo, ha permesso di classificare il virus in 8 genotipi maggiori, identificati con lettere alfabetiche da A ad H, e più recentemente due genotipi minori, I e J. I genotipi A-D, F ed I si suddividono ulteriormente in sottotipi: 6 sottotipi per i genotipi A, B e D, 16 per il genotipo C, 4 per il genotipo F e 2 per il genotipo I. Si pensa che i diversi genotipi e sottotipi virali abbiano origine da un unico antenato comune che si è differenziato a seguito di eventi di ricombinazione. Attualmente, la divergenza genetica tra i genotipi risulta superiore a 7.5% mentre quella tra i sottotipi è compresa tra 4% e 8%<sup>103</sup> (Figura 18).

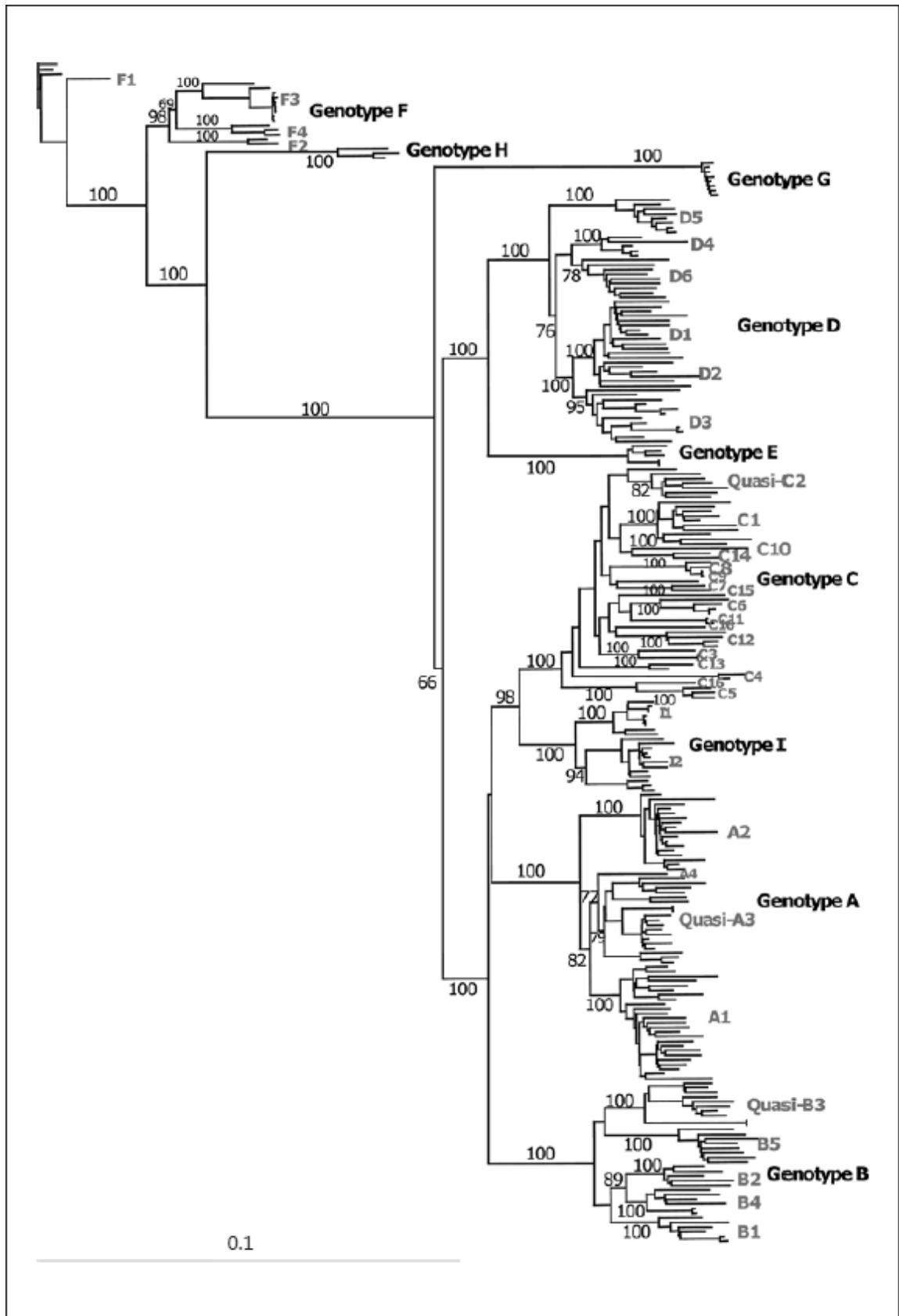


Figura 18: Albero filogenetico costituito da 250 genomi completi di HBV rappresentativi dei 9 genotipi e dei rispettivi sottotipi virali.

La variabilità genetica tra i genotipi di HBV non è legata solamente a sostituzioni di singoli nucleotidi lungo il genoma virale, bensì genotipi diversi possono presentare molecole di DNA di lunghezza differente: la maggior parte possiede un genoma di 3215 nucleotidi (nt), tuttavia alcuni genotipi hanno acidi nucleici più lunghi o più corti in seguito ad inserzioni o delezioni di sequenze oligonucleotidiche. In particolare, il genotipo A presenta un'inserzione di 6 nt in prossimità dell'estremità 3' del gene core, i genotipi D ed E hanno rispettivamente una delezione di 33 e 3 nt al 5' della regione pre-S1, il genotipo G presenta un'inserzione di 36 nt all'estremità 5' del gene core ed una delezione di 3 nt al 5' di pre-S1, mentre il genotipo J presenta una delezione di 33 nt all'estremità 5' della regione pre-S1<sup>69</sup>.

I genotipi di HBV hanno una distribuzione geografica eterogenea. Il genotipo A è ampiamente diffuso in Africa nord-occidentale, nell'Europa settentrionale e negli Stati Uniti d'America. I genotipi B e C si trovano entrambi in Asia orientale. Il genotipo D è prevalente nei Paesi europei del bacino del Mediterraneo, ma è presente anche in Africa e soprattutto in India. Il genotipo E è endemico in Africa centro-occidentale e difficilmente si trova in altri Paesi, fatta eccezione per soggetti di origine africana. Il genotipo F rappresenta il ceppo virale di HBV più diffuso nell'America centro-meridionale ed in Alaska. Il genotipo G è confinato tra le comunità omosessuali di USA, Germania e Francia. Infine, il genotipo H prevale in Messico<sup>69,103-106</sup>.

I genotipi I e J, scoperti più recentemente, hanno una distribuzione globale più limitata: il genotipo I è stato identificato per la prima volta in Vietnam e successivamente in Laos, India e Cina<sup>107-110</sup>; il genotipo J è stato attualmente isolato in un solo soggetto di nazionalità cinese vissuto per molto tempo sull'isola asiatica di Borneo. L'unica sequenza di questo genotipo clusterizza con sequenze di HBV non umano (gibboni, orangutanghi, scimpanzé e gorilla) facendo ipotizzare l'insorgenza di un ricombinante tra genotipo C umano e ceppi di HBV di gibboni oppure un caso di trasmissione cross-specie dall'animale all'uomo<sup>111,112</sup>.

In generale in ogni area geografica vi è un genotipo predominante, tuttavia genotipi diversi possono co-circolare nello stesso territorio. La distribuzione geografica dei genotipi di HBV è anche influenzata da etnicità e flussi migratori: negli Stati Uniti d'America gli immigrati provenienti dall'Asia sono infetti da genotipo B o C; in Europa, seppure i genotipi predominanti sono D (Europa meridionale) ed A (Europa settentrionale), i migranti provenienti dall'Africa presentano genotipo E; infine il genotipo I si è diffuso dal Vietnam al Canada ed alla Francia proprio attraverso migrazioni ed adozioni<sup>69,103,105</sup> (Figura 19).

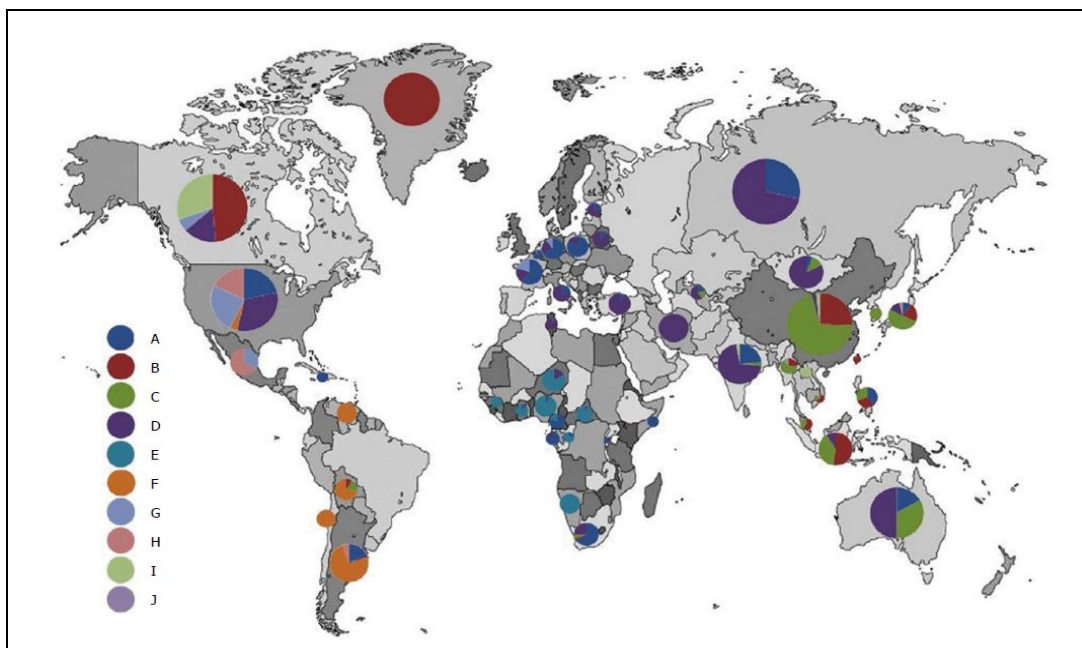


Figura 19: Distribuzione geografica mondiale dei genotipi di HBV.

Studi condotti su genotipi e sottotipi di HBV hanno messo in evidenza che in base al ceppo infettante vi sono differenze significative in merito alla via di trasmissione dell'infezione, alla severità e progressione della patologia ed alla reattività nei confronti della terapia anti-virale.

I genotipi virali B e C sono più comuni nei Paesi ad elevata endemia dove la trasmissione dell'infezione avviene per via verticale perinatale, mentre gli altri genotipi si trasmettono per via orizzontale. Inoltre, le infezioni causate da questi genotipi presentano livelli di HBV-DNA intracellulare ed extracellulare molto più elevati rispetto ad altri genotipi, come A e D<sup>69,105</sup>.

I genotipi A, B, C, D e F sono associati ad un maggior rischio di complicanze epatiche, come insorgenza di cirrosi e sviluppo di epatocarcinoma. Il genotipo G, in presenza di HIV o altro genotipo di HBV, aumenta il rischio di fibrosi epatica.

I genotipi C, D e G appaiono più resistenti alla terapia anti-virale con interferone rispetto ad altri genotipi come A e B. Ad oggi, non sono state invece riscontrate differenze nella risposta agli analoghi nucleosidici<sup>69,105</sup>.

Le caratteristiche generali di genotipi e sottotipi di HBV sono riassunte in Tabella 2.

Genotipo	Lunghezza Genoma	Sottotipi	Sierotipi	Distribuzione Geografica	Principale Via di Trasmissione	Caratteristiche Cliniche
<b>A</b>	<b>3,221 nt</b> (inserzione 6 nt al 3' del gene core)	A1-A6	ayw1 - ayw2 adw2 - adw4	A1 : Africa - Asia meridionale A2 : Europa - Nord America - Giappone (recentemente) A3-A6 : Africa - Haiti	orizzontale (parenterale o sessuale)	Elevata tendenza a cronicizzare. Sieroconversione precoce ed elevata positività per HBeAg. Buona risposta ad interferone.
<b>B</b>	<b>3,215 nt</b>	B1-B6	ayw1 adw2 adr	B1 : Giappone B2 : Asia orientale (Cina) B3 : Indonesia - Filippine - Cina B4 : Vietnam - Cambogia B5/B6 : Groenlandia (eschimesi)	perinatale (verticale)	Principale causa di infezione cronica da HBV nell'Asia orientale, quindi maggiore rischio di insorgenza di cirrosi ed epatocarcinoma. Precoce sieroconversione per HBeAg, ma bassa positività. Buona risposta ad interferone.
<b>C</b>	<b>3,215 nt</b>	C1-C16	ayw2 - ayw3 ayr adw2 adr	C1 : Thailandia - Vietnam - Myanmar C2 : Giappone - Cina - Corea C3 : Polinesia - Nuova Caledonia C4 : Australia (popolazione aborigena) C5-C12 : Indonesia - Filippine C13-C16 : Indonesia	perinatale (verticale)	Principale causa di infezione cronica da HBV nell'Asia orientale, quindi maggiore rischio di insorgenza di cirrosi ed epatocarcinoma. Sieroconversione per HBeAg tardiva, ma elevata positività. Scarsa risposta ad interferone.
<b>D</b>	<b>3,182 nt</b> (delezione 33 nt al 5' della regione pre-S1)	D1-D6	ayw2 ayw3 - ayw4 adw3	D1 : Asia centrale D2 : Europa - Africa - Giappone - Libano D3 : distribuzione globale D4 : Australia - Micronesia - Papua Nuova Guinea D5 : India D6 : Africa (Tunisia - Algeria)	orizzontale (parenterale; tossicodipendenza come principale fattore di rischio)	Principale causa di infezione acuta da HBV. Sieroconversione ritardata e scarsa positività per HBeAg. Quando causa infezione cronica tende a provocare danni epatici più severi rispetto ad altri genotipi (es. gtA). Scarsa risposta ad interferone.
<b>E</b>	<b>3,212 nt</b> (delezione 3 nt al 5' della regione pre-S1)	-	ayw4	Africa centrale e occidentale	orizzontale	
<b>F</b>	<b>3,215 nt</b>	F1-F4	ayw4 adw2 - adw4	F1 : Argentina - Costa Rica - El Salvador - Alaska F2 : Nicaragua - Venezuela - Brasile F3 : Venezuela - Colombia F4 : Argentina	orizzontale	Le infezioni rilevate nella popolazione nativa dell'Alaska hanno mostrato uno sviluppo precoce dell'epatocarcinoma rispetto all'infezione causata da altri genotipi.
<b>G</b>	<b>3,248 nt</b> (inserzione 36 nt al 5' del gene core e delezione 3 nt al 5' della regione pre-S1)	-	adw2	USA - Messico - Germania - Italia - Gran Bretagna - Francia	orizzontale (sessuale; soprattutto in omosessuali)	Co-infezione con HIV o altri genotipi di HBV porta a danni epatici più severi. Scarsa risposta ad interferone.
<b>H</b>	<b>3,215 nt</b>	-	adw4	Messico - Giappone - Nicaragua - USA	orizzontale	
<b>I</b>	<b>3,215 nt</b>	I1-I2	ayw2 adw2	I1 : Laos - Vietnam - Cina I2 : Laos - Vietnam - India	orizzontale e perinatale	Maggiore prevalenza negli uomini rispetto alle donne. Associato ad un maggior rischio di sviluppo di tumore epatico.
<b>J</b>	<b>3,182 nt</b> (delezione 33 nt al 5' della regione pre-S1)	-	ayw3	Giappone (isola di Borneo)	orizzontale	L'unico soggetto infetto da questo genotipo presentava epatocarcinoma

Tabella 2: Caratteristiche virologiche e cliniche dei genotipi di HBV.

Inoltre, le infezioni da HBV possono essere causate da uno o più ceppi virali. Uno stesso soggetto può quindi essere co-infettato da diversi genotipi. Conseguenza della co-infezione è l'insorgenza di forme virali ricombinanti. I ricombinanti più diffusi sono di tipo D/E (ricombinazione tra ceppi di genotipo D con ceppi di genotipo E). I siti di ricombinazione più frequenti si trovano a livello del gene core ed in minore quantità nella regione pre-S<sup>69,105</sup>.

### Mutanti virali

Diversi studi riportano che nell'acido nucleico di HBV si osservano diverse mutazioni in differenti regioni genomiche. Si tratta principalmente di mutazioni puntiformi casuali insorte a seguito di pressione selettiva esterna o emerse durante il ciclo replicativo virale. Queste mutazioni aiutano il virus a sfuggire e sopravvivere all'azione del sistema immunitario dell'ospite ed ai trattamenti terapeutici<sup>113</sup>.

Le mutazioni maggiormente studiate coinvolgono l'ORF pre-C/C: si tratta di mutazioni che alterano la sintesi di HBeAg a livello trascrizionale o traduzionale, ma incrementano la replicazione virale. Una delle mutazioni più comuni consiste in una doppia sostituzione nucleotidica alle posizioni 1762 e 1764 del genoma di HBV in cui, rispettivamente, un'adenina viene sostituita da una timina (A1762T) ed una guanina da un'adenina (G1764A). Questa doppia mutazione porta ad una riduzione fino al 70% della sintesi di HBeAg. È stato, infatti, osservato che in presenza di A1762T/G1764A diminuisce il legame dei fattori trascrizionali epatici all'HBV-DNA risultando in una diminuzione della trascrizione di mRNA dall'ORF pre-C/C e di conseguenza in una riduzione della produzione di HBeAg. Nonostante dall'ORF pre-C/C venga trascritto anche l'RNA pre-genomico (pgRNA) coinvolto nella replicazione virale, la doppia mutazione A1762T/G1764A non influenza negativamente la nuova produzione di HBV-DNA, ma al contrario ne promuove il processo aggravando il quadro clinico epatico del soggetto infetto. Questa doppia mutazione è stata riscontrata principalmente nel genotipo A e nei genotipi B, C e D<sup>32,105,114</sup>. La mutazione con impatto biologico più significativo consiste, invece, nella sostituzione di una guanina con un'adenina a livello del nucleotide 1896 del genoma virale (G1896A). Questa transizione porta alla conversione del codone del triptofano (TGG) in un codone di stop (TAG) con conseguente blocco della produzione di HBeAg in quanto termina precocemente la traduzione di tale proteina virale. La mutazione G1896A risulta più frequente in certi genotipi virali per i quali risulta influenzare il ciclo replicativo e la severità della patologia epatica. Infatti, questa mutazione si localizza nella struttura  $\epsilon$  di pgRNA, altamente conservata ed essenziale per la replicazione del genoma virale. Il DNA dei genotipi B, D, E, G e di alcuni ceppi del genotipo C è caratterizzato da una timina in posizione 1858 che, in presenza della mutazione G1896A, va ad appaiarsi all'adenina del nucleotide 1896, stabilizzando la struttura ad  $\epsilon$  di pgRNA ed aumentando la replicazione di HBV-DNA<sup>115,116</sup>. Queste mutazioni descritte a livello della regione pre-C/C (A1762T/G1764A e G1896A) possono insorgere singolarmente ma anche contemporaneamente. Di conseguenza, il soggetto infetto dal mutante A1762T/G1764A e/o dal mutante G1896A presenta bassi livelli di HBeAg in circolo ed espressione quasi nulla dell'antigene sulla superficie degli epatociti, i quali sfuggono all'azione da parte delle cellule del sistema immunitario dell'ospite prolungando l'infezione ed aggravando il quadro clinico con insorgenza di patologie epatiche croniche, quali fibrosi severa, cirrosi ed epatocarcinoma<sup>117-119</sup>. L'infezione sostenuta da queste varianti virali non solo presenta un decorso clinico più severo rispetto a quella sostenuta dal ceppo wild type, ma si associa anche ad una risposta meno efficace alla terapia con interferone<sup>120</sup>.

A livello dell'ORF pre-C/C sono state osservate anche altre alterazioni genomiche che vanno ad interessare la regione X, in quanto le due ORF sono in parte sovrapposte. Si tratta principalmente di mutazioni puntiformi quali T1753C, A1762T, G1764A e T1768A, che portano rispettivamente alle sostituzioni amminoacidiche nella proteina HBx I127T, K130M, V131I e F132Y, aumentando il rischio di carcinogenesi epatica. Infine, sono state descritte delezioni o inserzioni nucleotidiche nella regione pre-C/C che portano ad un cambiamento di frame nel gene X con la conseguente formazione di una proteina HBx tronca nella porzione C-terminale contenente il dominio di trans-attivazione<sup>65,121-123</sup>.

Oltre alla regione pre-C/C anche l'ORF pre-S/S si è rivelata una porzione genomica critica per l'emergenza di mutanti virali in grado di evadere la risposta immunitaria dell'ospite. Mentre i mutanti pre-C/C sembrano in grado di eludere la risposta di tipo cellulo-mediata, i mutanti dell'envelope sfuggono al riconoscimento da parte degli anticorpi neutralizzanti prodotti in seguito ad infezione naturale o stimolazione antigenica indotta da vaccino. Di notevole impatto biologico sono le mutazioni che insorgono a livello del determinante  $\alpha$  (aa 124-147) nella porzione MHR dell'antigene HBs. Il determinante  $\alpha$  possiede i principali epitopi neutralizzanti in grado di fornire protezione contro l'infezione da HBV. Data l'elevata immunogenicità del determinante  $\alpha$ , la proteina HBsAg è il costituente principale degli attuali vaccini anti-epatite B e gli anticorpi anti-HBs vengono utilizzati nei saggi immunoenzimatici per l'individuazione di soggetti infetti da HBV. Le mutazioni a carico del determinante  $\alpha$ , che insorgono sotto pressione selettiva naturale esercitata dal sistema immunitario dell'ospite oppure a seguito di immunoprofilassi, possono alterare l'antigenicità di HBsAg e portare all'insorgenza di varianti virali non più riconosciute dagli anticorpi neutralizzanti. Questi mutanti virali potrebbero favorire l'instaurarsi di infezioni da HBV in soggetti sieroprotetti poiché sfuggendo alla risposta immunitaria dell'ospite possono replicare nonostante la presenza di anti-HBs, inoltre possono portare a risultati falsi-negativi nei test immunoenzimatici. I mutanti della regione S potrebbero quindi costituire un potenziale problema per l'efficacia della vaccinazione e la sicurezza del sangue in ambito trasfusionale. Affinché il determinante  $\alpha$  possa essere riconosciuto dagli anticorpi neutralizzanti è fondamentale che presenti la struttura a doppia ansa che lo caratterizza<sup>113,124-126</sup>. Per mantenere intatta questa conformazione un ruolo importante viene svolto dalle cisteine in posizione 121, 124, 137 e 139<sup>124</sup>. La sostituzione di uno di questi amminoacidi porta ad un cambiamento conformazionale di HBsAg tanto da non essere più riconosciuto dagli anticorpi neutralizzanti anti-HBs. Nel corso del tempo diverse mutazioni a carico del determinante  $\alpha$  sono state riportate dai vari autori (Figura 20), tuttavia l'effettivo impatto clinico di molte di tali mutazioni e i meccanismi di pressione selettiva che le hanno determinate devono essere ulteriormente indagati<sup>127</sup>. La prima mutazione puntiforme individuata a livello del determinante  $\alpha$ , in grado di alterare la conformazione della proteina HBsAg al punto di perdere le sue proprietà antigeniche, è stata la sostituzione nucleotidica di una guanina con un'adenina in posizione 587 del gene S con conseguente scambio dell'amminoacido glicina con arginina in posizione 145 (G145R). E' ormai riconosciuto che tale mutazione sarebbe insorta a seguito della pressione selettiva esercitata dall'immunoprofilassi. La mutazione G145R è stata osservata per la prima volta in Italia in un bambino nato da madre HBsAg positiva al quale è stata diagnosticata un'infezione da HBV nonostante alla nascita avesse ricevuto profilassi attiva e passiva con conseguente sviluppo di un'adeguata risposta anticorpale anti-HBs<sup>128,129</sup>. Successivamente, tale mutazione è stata rilevata in diversi Paesi sia in pazienti trattati con

immunoglobuline specifiche anti-HBV sia in soggetti vaccinati<sup>130-133</sup>. Questa mutazione porta alla perdita di antigenicità di HBsAg poiché la glicina e l'arginina sono due amminoacidi di dimensioni differenti e con proprietà chimiche diverse tanto da alterare l'idrofobicità della proteina e da determinare la rottura della conformazione a doppio loop del determinante  $\alpha$  che pertanto non può più essere legato dagli anticorpi neutralizzanti anti-HBs diretti contro l'antigene wild type<sup>134</sup>. La mutazione G145R non comporta invece nessuna difficoltà di replicazione per il virus poiché non interessa la capacità di HBV di legarsi all'epatocita<sup>135,136</sup>. Inoltre, nonostante la mutazione, il virus mantiene inalterata la sua virulenza, come dimostrato da esperimenti di infezione di scimpanzé inoculati con virus mutati<sup>137</sup>.

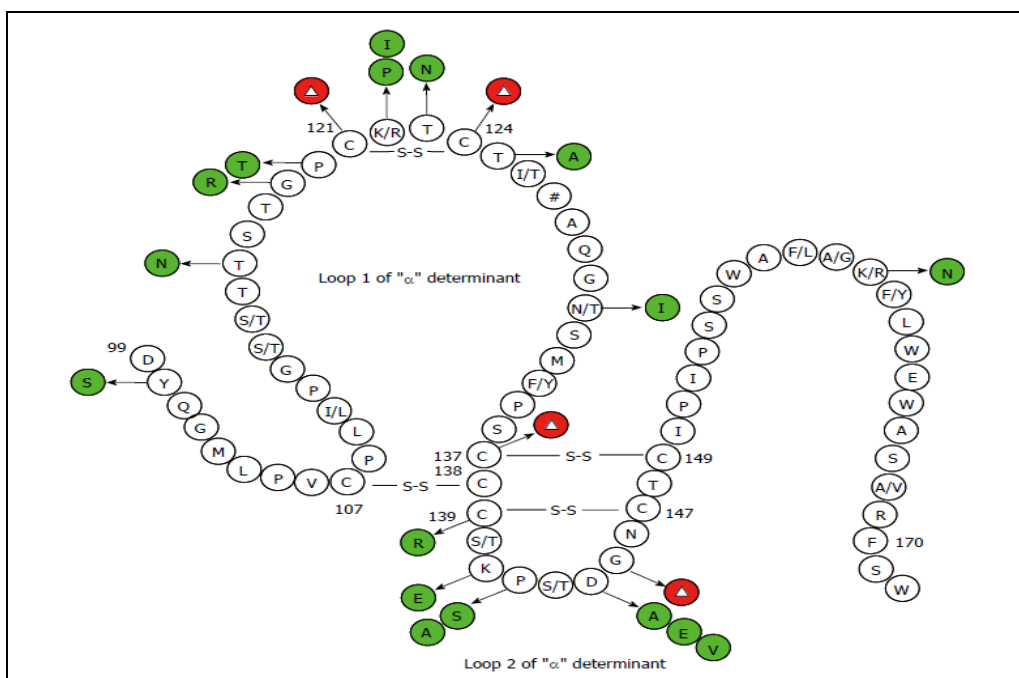


Figura 20: Mutazioni amminoacidiche a carico del determinante  $\alpha$  di cui è stato descritto un effetto sull'antigenicità di HBsAg attraverso studi funzionali (cerchi verdi e rossi). I cerchi rossi con il simbolo  $\Delta$  indicano la possibilità di sostituzioni amminoacidiche multiple. In posizione 127, il simbolo # indica variabilità amminoacidica genotipo-specifica.

Oltre al gene S, anche la regione pre-S è interessata da numerose alterazioni genomiche, tanto da risultare la porzione di HBV-DNA con maggiore variabilità genetica. Le proteine pre-S1 e pre-S2, infatti, sono anch'esse esposte sulla superficie virale e quindi sono soggette alla pressione esercitata dal sistema immunitario dell'ospite. A livello della regione pre-S sono state osservate mutazioni puntiformi, delezioni ed eventi di ricombinazione genetica. In particolare, ampie delezioni in-frame sono state individuate tra l'estremità 3' di pre-S1 e l'estremità 5' di pre-S2 con conseguente perdita, rispettivamente, del dominio C-terminale e N-terminale nelle due proteine. Alcune di queste delezioni portano all'eliminazione degli epitopi riconosciuti dalle cellule del sistema immunitario dell'ospite senza però alterare la capacità del virione di legarsi all'epatocita; ne consegue la



possibilità del virus di infettare la cellula ospite senza essere riconosciuto dal sistema immunitario, inducendo quindi uno stato di infezione cronica<sup>138,139</sup>.

L'introduzione di terapie anti-virali basate sull'uso di analoghi nucleosidici o nucleotidici per il trattamento dell'infezione cronica da HBV può portare all'insorgenza di mutazioni a livello dell'ORF P ed in particolare del dominio Pol/RT. Questo dominio, infatti, permette la sintesi della polimerasi virale, la cui attività costituisce il bersaglio degli attuali farmaci anti-virali. Le resistenze insorte nei confronti di questi agenti vanno ad interferire con l'efficacia a lungo termine della terapia causando il fallimento del trattamento, la ripresa della replicazione virale e quindi la progressione della malattia epatica con possibile esito fatale. I mutanti del gene P più studiati sono quelli legati alla resistenza alla lamivudina: tali mutazioni sono localizzate a livello dell'amminoacido 204 (rtM204I/V/S) nel locus denominato YMDD del sotto-dominio C di Pol/RT<sup>113,140</sup>. Queste mutazioni riducono la replicazione virale, di conseguenza sono spesso affiancate da mutazioni compensatorie come rtL180M<sup>141</sup>. Più recentemente, sono state osservate altre mutazioni al di fuori del locus YMDD che sembrano favorire l'insorgenza di varianti virali resistenti al trattamento<sup>142,143</sup>. La resistenza alla lamivudina porta alla selezione di varianti virali con elevata capacità replicativa, si tratta di una resistenza che aumenta progressivamente con l'aumentare del tempo di trattamento. I fattori che apparentemente aumentano il rischio di resistenza alla terapia sono l'elevata carica virale nel siero in fase di pre-trattamento, elevati livelli di ALT ed incompleta soppressione della replicazione virale da parte del farmaco<sup>144</sup>. Seppur con minore frequenza, sono state riscontrate altre mutazioni nel dominio Pol/RT che portano alla resistenza nei confronti di altri farmaci anti-virali. In particolare, la resistenza nei confronti dell'adefovir dipivoxil è caratterizzata dalla sostituzione rtA181V/T nel sotto-dominio B e/o da rtN236T nel sotto-dominio D<sup>145,146</sup>, la resistenza all'entecavir richiede mutazioni multiple (rtI169T, rtT184S, rtS202I e rtM250I/V) che si verificano in maniera sequenziale in un virus lamivudina-resistente<sup>113,147,148</sup>, mentre non sembrano esistere mutazioni specifiche che portano alla resistenza al tenofovir, tuttavia una riduzione dell'effetto terapeutico è stato osservato in presenza di sostituzioni amminoacidiche che caratterizzano i virus adefovir-resistenti<sup>149,150</sup>.

Poiché nel genoma di HBV l'ORF P è sovrapposta al gene S, alcune alterazioni nucleotidiche (come rtV173L, rtL180M, rtM204V) associate all'insorgenza di mutanti virali resistenti al trattamento possono causare sostituzioni amminoacidiche a carico di HBsAg (come E164D e I195M) in grado di alterarne la struttura a doppio loop ed impedirne il riconoscimento da parte degli anticorpi neutralizzanti anti-HBs<sup>151-152</sup>. Anche in questa circostanza vengono selezionati varianti virali in grado di sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite e capaci di replicare nonostante sieroprotezione sviluppata in seguito ad infezione naturale o immunoprofilassi.

Nel corso del tempo, l'implementazione di strategie di immunoprofilassi e l'introduzione di trattamenti anti-virali per il controllo delle infezioni da HBV hanno perciò portato all'insorgenza di mutanti in grado di mettere in discussione l'efficacia di queste misure preventive e terapeutiche. In

effetti negli ultimi anni sporadiche nuove infezioni da ceppi di HBV mutati in soggetti immunizzati e/o trattati con farmaci anti-virali sono state osservate e descritte a livello mondiale. Risulta perciò fondamentale un continuo monitoraggio su scala globale dell'epidemiologia delle infezioni da HBV per meglio comprendere l'impatto dei mutanti virali in termini di sanità pubblica e per mantenere sotto controllo la diffusione dell'infezione.

## **INFEZIONE DA HBV**

### **Modalità di trasmissione**

La sorgente d'infezione di HBV è rappresentata dai soggetti infetti e la trasmissione avviene da persona a persona tramite fluidi corporei contenenti le particelle virali, in particolare sangue e suoi derivati, ma anche saliva, liquido spermatico e secrezioni cervico-vaginali<sup>2,153,154</sup>.

HBV può essere trasmesso:

- *Verticalmente* → per trasmissione del virus dalla madre al figlio
- *Orizzontalmente* → per contatto interpersonale diretto o indiretto.

La trasmissione verticale di HBV si verifica alla nascita, per contatto diretto con sangue e secrezioni vaginali infette durante il passaggio attraverso il canale del parto. Si parla perciò di *infezione perinatale*. Questa via di trasmissione è la più diffusa modalità di contagio per HBV nei Paesi in via di sviluppo<sup>2,155</sup>.

La trasmissione orizzontale avviene per *via parenterale* (apparente o inapparente) e per *via sessuale* attraverso il contatto percutaneo o mucosale con liquidi biologici infetti. Poiché il virus sopravvive all'esterno dell'organismo per circa 7 giorni, l'infezione può essere trasmessa anche attraverso veicoli, ovvero oggetti contaminati da fluidi corporei infetti come ad esempio, aghi, rasoi, forbici, spazzolini dentali, pettini o spazzole da bagno contaminate da materiale biologico infetto. Sono pertanto soggetti a rischio di contagio i tossicodipendenti, il personale sanitario e laboratoristico a contatto con persone infette e/o con l'agente infettivo, chi pratica sesso non protetto, in particolare omosessuali maschi ed eterosessuali con partner multipli, ma anche i contatti familiari e sessuali di soggetti infetti e tutti coloro suscettibili all'infezione che si sottopongono a pratiche mediche ed estetiche che prevedono l'impiego di aghi, siringhe, oggetti taglienti o strumenti invasivi se contaminati dal virus e non adeguatamente sterilizzati (ad esempio esami endoscopici, operazioni chirurgiche, cure dentarie, manicure, pedicure, tatuaggi, piercing, trattamenti estetici). La trasmissione sessuale e l'assunzione di droghe per via iniettiva sono le principali vie di diffusione dell'infezione da HBV nei Paesi industrializzati<sup>2</sup>.

La trasmissione dell'infezione può avvenire anche attraverso trasfusioni di sangue o emoderivati infetti. Questa via di contagio è ancora presente nei Paesi in via di sviluppo, mentre il rischio è quasi nullo nei Paesi industrializzati, grazie all'introduzione di stringenti procedure di selezione dei donatori di sangue (donazione di sangue volontaria e non retribuita con controlli sanitari periodici per i donatori) e l'introduzione di test di screening per la rilevazione di marcatori virali nei prodotti della donazione<sup>155,156</sup>.

## **Patogenesi**

Tra le peculiarità che contraddistinguono il virus dell'epatite B vi è l'elevato tropismo per le cellule epatiche e la scarsa citotossicità diretta nei confronti degli epatociti che vengono infettati in corso di infezione<sup>13</sup>.

Il controllo della replicazione virale e la gravità del danno epatico a seguito di infezione da HBV sono, infatti, fortemente dipendenti dall'azione del sistema immunitario dell'ospite che interviene per contrastare l'infezione<sup>157-159</sup>.

Come dimostrato da modelli sperimentali in vitro ed in vivo con l'impiego di scimpanzé, nelle fasi iniziali dell'infezione l'HBV appare un virus "invisibile" poiché, a differenza di altri patogeni, non induce i pathway cellulari che portano all'attivazione della risposta immunitaria innata o naturale dell'ospite<sup>160,161</sup>. Di conseguenza, per fronteggiare l'infezione da HBV è necessario l'intervento delle cellule dell'immunità adattativa che per attivarsi necessita di alcune settimane (6-8 settimane) dall'evento del contagio. In particolare, l'infezione da HBV può essere adeguatamente controllata quando si attivano le risposte linfocitarie di tipo T HBV-specifiche. Queste risposte si attivano tempestivamente dopo l'inizio della fase di replicazione esponenziale del virus, raggiungendo generalmente il massimo picco quando la viremia è già in fase di calo<sup>162</sup>. Con la risoluzione dell'infezione la frequenza delle cellule T HBV-specifiche cala notevolmente ed infine permangono solo le cellule T della memoria, rilevabili per 20-30 anni post-esposizione virale.

Tra le risposte linfocitarie di tipo T HBV-specifiche un ruolo fondamentale viene svolto dalle cellule CD8+ coinvolte sia nella clearance virale sia nella patogenesi della malattia epatica. I linfociti CD8+ raggiungono il tessuto epatico ed identificano gli epatociti infetti mediante il riconoscimento di corte sequenze peptidiche derivate dal processamento intracellulare di proteine virali ed esposte sulla superficie cellulare attraverso molecole HLA (antigene leucocitario umano) di classe I presenti su tutte le cellule nucleate dell'organismo<sup>163</sup>. L'azione dei linfociti CD8+ nei confronti degli epatociti infetti si esplica attraverso due meccanismi: da un lato distruggono le cellule infette mediante la loro capacità litica ed inducendone l'apoptosi, dall'altro lato intervengono con un processo non-citopatico di tipo citochino-mediato in modo tale da eliminare il patogeno intracellulare salvaguardando gli epatociti. Quest'ultimo meccanismo si basa sulla secrezione dell'interferone  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) che attiva una serie di segnali a cascata in grado di reclutare le cellule immunitarie alla base del processo infiammatorio e di inibire l'espressione genica e la replicazione di HBV; viene quindi favorita la clearance virale evitando una completa distruzione delle cellule del fegato<sup>164</sup>.

Seppure studi precedenti abbiano dimostrato che l'immunità innata dell'ospite non sembra essere attivata da HBV nelle primissime fasi del contagio, non ancora del tutto chiaro resta il ruolo svolto dalle cellule natural killer (NK). Un recente studio ha verificato che le cellule NK contribuiscono all'attivazione delle risposte adattative dell'ospite ed in particolare sembrano promuovere il meccanismo non-citopatico INF- $\gamma$ -dipendente mediato dalle cellule CD8+. Da questo studio emerge che i linfociti T CD8+ sono sicuramente il principale effettore del processo di clearance virale, tuttavia le cellule NK sembrano essere delle importanti aiutanti della risposta anti-virale CD8+ citochino-mediata<sup>165</sup>.

Affinché la risposta immune adattativa che coinvolge le cellule CD8+ possa essere efficace nel contrastare l'infezione da HBV, risulta comunque fondamentale il contributo da parte dei linfociti CD4+. Le cellule CD4+ devono attivarsi precocemente in seguito al contagio, in modo tale da stimolare la presentazione delle sequenze peptidiche antigeniche sulla superficie cellulare che permettono il riconoscimento delle cellule infette ad opera dei linfociti CD8+, i quali, attivandosi, innescano i meccanismi di eliminazione virale<sup>166</sup>.

Una ridotta attivazione dei linfociti CD4+ porta ad un debole innesco dei CD8+ e quindi ad un'inadeguata risposta da parte dei linfociti T HBV-specifici in fase acuta. Nonostante i fattori che riducono l'attività dell'immunità adattativa non siano ancora stati univocamente identificati, gli studi condotti nel corso degli anni hanno permesso di osservare che alla base della persistenza di HBV vi sono risposte deficitarie da parte dei linfociti T HBV-specifici in fase acuta. Infatti, comparando la fase acuta dell'infezione in pazienti in cui tale infezione si risolve rispetto a pazienti in cui cronicizza è possibile osservare che nel secondo caso le risposte adattative sono deboli o assenti a differenza del primo caso in cui appaiono molto più intense<sup>167,168</sup>.

Studi condotti su scimpanzé hanno infine sottolineato che la tendenza dell'infezione a cronicizzare sembra essere legata alla carica virale nella primissima fase post-contagio: in particolare, basse cariche virali stimolerebbero in maniera ridotta le risposte immunitarie adattative di tipo T HBV-specifico dell'ospite aumentando il rischio di persistenza del virus nel soggetto infetto<sup>162,169</sup>.

Le risposte linfocitarie T HBV-specifiche sono anche coinvolte nell'attivazione dei linfociti B responsabili della risposta anticorpale.

La risposta anticorpale è rivolta verso differenti proteine di HBV (HBc, HBs e HBe) portando alla produzione di anticorpi-specifici che permettono di distinguere tra le diverse fasi cliniche dell'infezione. In fase di infezione acuta vengono prodotti sia anticorpi anti-HBc sia anti-HBs, tuttavia solo gli anticorpi contro le proteine dell'envelope sono neutralizzanti, ovvero anticorpi protettivi implicati nel controllo del virus e nella risoluzione dell'infezione.

La comparsa di anticorpi neutralizzanti contro HBsAg (in particolare contro il determinante *a* di HBsAg) avviene però tardivamente rispetto all'esposizione al patogeno, quindi la risposta immune anticorpale non è coinvolta nelle prime fasi di un'infezione acuta da HBV. Questo tipo di risposta adattativa si attiva in un secondo momento e previene la diffusione dell'infezione, ovvero evita che il patogeno possa passare da una cellula infetta ad una cellula suscettibile. Gli anticorpi anti-HBs sono generalmente rilevati nei paziente in cui l'infezione da HBV è in fase di risoluzione, mentre non sono presenti in caso di infezione cronica; vi sono tuttavia delle eccezioni, di conseguenza resta ancora da chiarire il contributo di questi anticorpi in fase di cronicizzazione<sup>170</sup>.

Gli anticorpi neutralizzanti anti-HBs sono inoltre gli anticorpi che vengono prodotti in seguito a stimolazione antigenica da vaccino, in quanto tutte le attuali composizioni vaccinali contengono come antigene la proteina HBsAg. Questi anticorpi svolgono un ruolo protettivo nei soggetti vaccinati bloccando il patogeno in circolo ed impedendo l'instaurarsi dell'infezione<sup>157,159</sup>.

In presenza di infezione cronica, meccanismi multifattoriali che comprendono sia fattori virali sia fattori dell'ospite contribuiscono all'insorgenza del danno epatico ed alla sua progressione in carcinoma. È stato da tempo osservato che l'epatocarcinoma insorto in seguito ad infezione da HBV

può essere indotto dall'integrazione del genoma virale nel DNA cellulare dell'ospite. Questo processo crea microdelezioni o alterazioni geniche che vanno a sregolare i meccanismi di controllo del ciclo cellulare favorendo la trasformazione tumorale. Oltre all'integrazione di HBV-DNA nel materiale genetico cellulare, vi sono anche alcune proteine virali che possono partecipare direttamente allo sviluppo del tumore del fegato. Per esempio, la proteina HBx e le proteine dell'envelope MHBs e LHBs possono svolgere un ruolo di trans-attivatori dei geni cellulari associati al ciclo cellulare. Queste proteine possono interagire ed interferire con l'attività di numerosi fattori trascrizionali e quindi contribuire all'epatocarcinogenesi attivando diversi promotori cellulari che alterano la regolazione del ciclo cellulare. Infine, una risposta immune inefficiente nei confronti di HBV non solo ne permette la persistenza nell'organismo ospite, ma si traduce in una continua distruzione del tessuto epatico che necessita una costante auto-riparazione legata alla sua capacità rigenerativa. Tuttavia, con il passare del tempo, il continuo alternarsi di distruzione e rigenerazione degli epatociti porta il tessuto epatico ad un perpetuo stato di infiammazione che progressivamente comporta l'insorgenza di fibrosi, la quale evolve in cirrosi, steatosi ed infine epatocarcinoma<sup>157-159</sup>.

## **Sintomatologia**

L'infezione da HBV ha un periodo di incubazione di circa 90 giorni (range 60-150) a seguito del contagio con il patogeno<sup>2</sup>.

Si tratta di un'infezione principalmente asintomatica, tuttavia alcune persone (soprattutto in base all'età di acquisizione) possono presentare sintomatologia in fase acuta. Generalmente, l'epatite B acuta risulta sintomatica negli adulti (1/3 degli adulti manifesta sintomi), mentre l'infezione decorre in maniera asintomatica nei bambini (90% nei soggetti <5-6 anni) e nei neonati (quasi 100%).

Quando presenti, i sintomi dell'infezione da HBV sono riconducibili a quelli tipici di un'epatite, ovvero fatica, perdita di appetito, disturbi addominali, nausea, vomito ed a volte ittero accompagnato da febbre di lieve entità.

La sintomatologia generalmente persiste per alcune settimane, ma in alcuni casi può prolungarsi fino ai sei mesi.

Solo una piccola quota (<1%) di infezioni da HBV (quasi esclusivamente nell'adulto) può determinare una necrosi massiva delle cellule del fegato che causa un'insufficienza epatica, la quale conduce rapidamente alla morte.

In altre persone, invece, l'infezione da HBV (sintomatica o asintomatica in fase acuta) può non risolversi spontaneamente e cronicizzare portando, col passare del tempo, a severe complicanze a livello del fegato, quali cirrosi ed epatocarcinoma<sup>2,153,154</sup>.

## Diagnosi di laboratorio

HBV è un virus difficile da coltivare, di conseguenza non sono state sviluppate tecniche di biologia cellulare per la diagnosi di infezione. La rilevazione di HBV si basa perciò su metodiche in grado di rilevare la presenza di marcatori virali, quali anticorpi, antigeni o materiale genetico virale, presenti nel circolo di un soggetto infetto.

I marcatori sierologici dell'infezione da HBV sono:

- antigene di superficie (HBsAg) e rispettivi anticorpi-specifici (anti-HBs)
- anticorpi contro l'antigene del core (anti-HBc IgM ed IgG)
- antigene ed anticorpi contro la proteina HBe (rispettivamente HBeAg ed anti-HBe)
- genoma virale (HBV-DNA).

Ogni marcatore ha un suo specifico significato clinico (Tabella 3). Per una corretta e completa diagnosi e per distinguere tra le diverse fasi di infezioni è opportuno prendere in considerazione tutti i marcatori sierologici di HBV<sup>153,171,172</sup>.

<b>Marcatore</b>	<b>Significato clinico</b>
<i>HBsAg</i>	primo marcatore di infezione da HBV positivo nella fase acuta dell'infezione la persistenza in circolo di questo marcatore indica infezione cronica può risultare negativo ai test immunoenzimatici in presenza di mutazioni non viene rilevato in siero nei casi di infezione occulta da HBV
<i>anti-HBs</i>	generalmente compaiono in fase di guarigione indicano risoluzione di un'infezione ed immunità nei confronti di HBV sono il solo marcatore rilevato in seguito a vaccinazione come indice di sieroconversione e sieroprotezione
<i>anti-HBc IgM</i>	sono il marcatore di un'infezione acuta recente scompaiono dopo circa 1 mese dal contagio
<i>anti-HBc IgG</i>	sono indice di esposizione ad HBV sono presenti sia in fase acuta che cronica risultano positivi anche in seguito a guarigione la presenza di questi anticorpi può indicare infezione occulta da HBV
<i>HBeAg</i>	indice di attiva replicazione virale ed elevata infettività può essere presente sia in fase acuta che cronica della malattia la persistenza in circolo di questo marcatore è indice di prognosi negativa può risultare negativo nonostante la capacità replicativa del virus in presenza di mutazioni nella regione pre-C/C
<i>anti-HBe</i>	compaiono in seguito alla scomparsa di HBeAg indicano riduzione o assenza di replicazione virale sono un marcatore di prognosi positiva.
<i>HBV-DNA</i>	marcatore di infezione da HBV indice di replicazione virale può avere concentrazione variabile nel siero marcatore per il monitoraggio dell'infezione e dell'efficacia della terapia anti-virale

Tabella 3: Significato clinico dei marcatori sierologici presenti in caso di infezione da HBV.



### HBsAg

È il principale marcatore d'infezione da HBV e, generalmente, il primo ad essere rilevato.

Oggi, HBsAg viene rilevato da 1 a 10 settimane dopo il contagio, grazie alle caratteristiche degli attuali test sierologici che hanno notevolmente ridotto il tempo di identificazione dell'antigene virale in circolo. HBsAg scompare con la risoluzione dell'infezione, mentre la persistenza in circolo per oltre 6 mesi identifica un'infezione cronica<sup>171,172</sup>.

Un test per HBsAg con risultato "negativo" non necessariamente indica assenza di infezione. Le principali ragioni per cui HBsAg può non essere rilevato nonostante l'avvenuto contagio (falsi-negativi) sono:

- presenza di mutazioni nella proteina HBsAg che portano ad un mancato riconoscimento da parte degli anticorpi (anti-HBs) utilizzati nei test sierologici<sup>173-175</sup>; tuttavia gli attuali test diagnostici sono validati per identificare una vasta gamma di mutazioni di HBsAg che con maggiore frequenza sono state rilevate e riportate in letteratura<sup>176-178</sup>;
- infezione occulta da HBV, ovvero una particolare infezione cronica da HBV sostenuta da virus competenti nella replicazione virale, ma che mostrano una forte soppressione dell'attività replicativa e dell'espressione genica risultando nell'assenza di HBsAg in circolo e nella scarsa produzione di HBV-DNA; questo quadro sierologico viene spesso identificato nei donatori di sangue ed è frequentemente caratterizzato dalla presenza di un altro marcatore virale, gli anticorpi anti-HBc<sup>179,180</sup>.

Negli ultimi anni ha acquisito significato clinico la quantificazione di HBsAg. È stata infatti osservata una correlazione tra la concentrazione di HBsAg in siero e l'attività trascrizionale del virus nella formazione di cccDNA. La quantificazione di HBsAg si rivela utile nei soggetti con infezione cronica trattati con interferone. Conoscere i livelli di HBsAg in circolo permette di monitorare l'efficacia del trattamento<sup>181-182</sup>.

### Anti-HBs

Sono anticorpi neutralizzanti che indicano immunità nei confronti di HBV. Compaiono generalmente in fase di risoluzione dell'infezione, mentre il livello di HBsAg diminuisce. Garantiscono protezione a lungo termine nei confronti del patogeno<sup>172</sup>.

Inoltre, sono il solo marcatore sierologico rilevabile nei soggetti vaccinati come indice di sieroconversione e di sieroprotezione, qualora la concentrazione di anti-HBs in circolo risulta rispettivamente  $>0.0$  UI/l e  $\geq 10.0$  UI/l<sup>183</sup>.

### Anti-HBc

Gli anticorpi anti-HBc compaiono nelle prime fasi di infezione e persistono nel tempo.

Questi anticorpi sono rilevabili circa 1-2 settimane dopo la comparsa in circolo di HBsAg e possono essere accompagnati dall'aumento della concentrazione delle aminotrasferasi (ALT) e dalla comparsa di eventuali sintomi di epatite. Mentre nelle prime fasi post-contagio sono rilevabili sia gli anti-HBc di classe M (IgM) sia di classe G (IgG), a distanza di qualche settimana dall'esposizione (circa 1 mese) permangono solo le IgG che persistono anche in seguito alla guarigione ed addirittura possono durare per tutta la vita, come indice di pregressa infezione da HBV<sup>172</sup>.

Gli anticorpi anti-HBc possono essere rilevati in assenza di HBsAg nei soggetti con infezione occulta da HBV. In questi casi si può avere una riattivazione virale con ricomparsa in circolo di HBsAg in condizioni di immunosoppressione o durante terapia chemioterapica<sup>179,180</sup>.

Gli attuali test diagnostici permettono la rilevazione degli anti-HBc totali o degli anti-HBc IgM; la presenza dei soli anticorpi anti-HBc IgG viene identificata nel momento in cui il test per anti-HBc totali risulta positivo mentre è negativo quello per anti-HBc IgM.

L'antigene del core non viene invece considerato un marcatore sierologico in quanto si tratta di una proteina intra-cellulare che quindi non può essere rilevata in circolo nei soggetti infetti<sup>172</sup>.

### HBeAg ed anti-HBe

HBeAg è un marcatore di attiva replicazione virale ed elevata infettività. È rilevabile in circolo dopo circa 6-12 settimane dal contagio e la sua persistenza oltre i 3-4 mesi è un indice di cronicizzazione dell'infezione.

La sieroconversione in anti-HBe indica riduzione o assenza di replicazione virale; gli anticorpi anti-HBe sono perciò un marcatore di prognosi positiva.

Tuttavia, è possibile l'identificazione di anticorpi anti-HBe nonostante la presenza di replicazione virale. Si tratta di soggetti infetti da mutanti nella regione pre-C/C in cui l'espressione di HBeAg è scarsa o nulla, tale da non essere rilevata dai test diagnostici, ma rimane inalterata la capacità replicativa del virus<sup>171,172</sup>.

## HBV-DNA

HBV-DNA non solo permette la diagnosi di infezione da HBV, ma, come per HBeAg, si tratta di un indicatore di replicazione virale.

La concentrazione di HBV-DNA è misurata in Unità Internazionali/millilitro (UI/ml) e, nel siero, è molto variabile; può non essere rilevabile o superare le  $10^8$  UI/ml<sup>172</sup>. È importante misurare la concentrazione di HBV-DNA per monitorare l'evolversi dell'infezione e la prognosi della malattia, ma anche in corso di terapia anti-virale al fine di definire l'efficacia del trattamento<sup>171,184,185</sup>.

## Campioni biologici e tecniche di laboratorio per la determinazione dei marcatori di HBV

Il campione di prima scelta per la diagnosi di infezione da HBV è il sangue; in particolare campioni di siero o plasma vengono impiegati di routine per eseguire test sierologici in grado di rilevare antigeni ed anticorpi, ma anche per saggi molecolari per la determinazione di HBV-DNA.

Antigeni ed anticorpi sono stabili per giorni a temperatura ambiente, per mesi a 4°C e addirittura per anni se congelati (-20/-70°C). Tuttavia è opportuno evitare l'emolisi del campione in quanto può interferire con la capacità dei test sierologici di rilevare in maniera specifica il marcatore d'interesse. Invece, per la determinazione di HBV-DNA mediante saggi molecolari è importante evitare la degradazione dell'acido nucleico virale che porterebbe a rilevare cariche virali sottostimate oppure risultati falsi-negativi. Affinché la degradazione di HBV-DNA nel campione non avvenga, il siero deve essere separato dalla componente cellulare del sangue entro 4 ore dal prelievo ematico e conservato a -20/-70°C evitando ripetuti congelamenti-scongelamenti (idealmente, massimo 8). Un metodo per conservare il DNA è l'impiego di EDTA da aggiungere al campione al fine di stabilizzare gli acidi nucleici. Il campione di siero con l'aggiunta di EDTA può essere conservato a 4°C fino a 5 giorni senza alterarne la carica virale<sup>186</sup>.

Negli ultimi anni, stanno nascendo tecniche in house per la rilevazione dei marcatori di HBV in campioni alternativi al campione di sangue liquido, come per esempio la saliva o campioni di sangue essiccato su carta da filtro (DBS)<sup>187-189</sup>. Anche la biopsia epatica permetterebbe la rilevazione di un'infezione da HBV. Tuttavia, questi campioni, per mancanza di test standardizzati o per difficoltà di raccolta, non vengono impiegati di routine per la diagnosi di infezione da HBV.

Test sierologici specifici per rilevare i marcatori di HBV sono stati sviluppati intorno agli anni '70. Svariate tecnologie possono essere impiegate per determinare la presenza di antigeni ed anticorpi virali in campioni di siero o plasma.

Il dosaggio radioimmunologico (RIA) è stato la prima tecnica impiegata per la diagnosi di HBV, la quale permette di dosare un composto immunogenico con l'impiego di reagenti marcabili

radioattivamente. Questo metodo ha elevata sensibilità, specificità e precisione, però richiede costi elevati e presenta rischi per l'operatore.

Il dosaggio RIA è stato quindi sostituito dai saggi immunoenzimatici (EIA) che sfruttano in maniera consecutiva una reazione immunologica antigene-anticorpo, per legare selettivamente il target d'interesse, ed una reazione enzimatica, in cui l'enzima esplica la sua attività a seguito dell'aggiunta di cromogeno/substrato permettendo la produzione di un segnale colorato misurabile qualitativamente ad occhio nudo e quantitativamente attraverso spettrofotometri. L'intensità del segnale colorato è proporzionale alla quantità di target presente nel campione. Il vantaggio di questo metodo include l'elevata riproducibilità, la maggiore sicurezza per l'operatore, la possibilità di automatizzarlo completamente ed il basso costo. Esistono diverse varianti di dosaggi immunoenzimatici, soprattutto se automatizzati, come per esempio la tecnologia MEIA (determinazione immunoenzimatica a cattura di micro-particelle) in cui il principio alla base del saggio immunoenzimatico viene sfruttato con l'impiego di micro-particelle in sospensione che fungono da supporto in fase solida, alle quali sono legati antigeni o anticorpi in base alla molecole target da rilevare. La tecnica MEIA permette l'esecuzione del test in tempi brevi rispetto ad altri saggi immunoenzimatici poiché l'impiego di micro-particelle in fase solida aumenta la cinetica di reazione e diminuisce i tempi di incubazione. Un altro dosaggio immunoenzimatico si basa sulla tecnologia CLIA (determinazione immunoenzimatica a chemiluminescenza) la quale utilizza come coniugati molecole luminescenti, ovvero in grado di emettere fotoni, che vengono misurati da un fotomoltiplicatore. Anche questa tecnica richiede tempi ridotti di esecuzione. I dosaggi immunoenzimatici sono sensibili e specifici, tuttavia necessitano di idonee apparecchiature sofisticate e costose per poter essere eseguiti. Per far fronte a questa situazione, negli ultimi anni sono stati sviluppati test di diagnosi rapida che utilizzano tecniche di agglutinazione, immunocromatografia, immunodot o immunofiltrazione. Questi test rapidi perdono però in sensibilità e specificità e sono quindi una valida alternativa in realtà con scarsità di infrastrutture<sup>188,190,191</sup>.

La determinazione di HBV-DNA avviene attraverso test molecolari basati sulla reazione a catena della DNA polimerasi (PCR). Gli attuali metodi molecolari impiegati per rilevare HBV-DNA sono generalmente real time PCR, commerciali o in-house, poiché non solo permettono di identificare l'acido nucleico virale, ma ne permettono anche la quantificazione. Infatti, non solo risulta importante la diagnosi di infezione da HBV, ma è altrettanto fondamentale monitorare la replicazione virale in corso di infezione per valutare la prognosi della malattia. Tutti i saggi molecolari impiegati per la determinazione di HBV-DNA, sia qualitativa che quantitativa, devono avere un ampio range dinamico (fino alle  $10^9$  UI/ml) ed essere altamente sensibili in modo tale da rilevare cariche virali anche al di sotto delle  $10^1$  UI/ml, riscontrabili nelle primissime fasi di infezione e nelle infezioni occulte da HBV. Il monitoraggio della carica virale di HBV è inoltre importante durante il trattamento con terapia anti-virale al fine di verificarne l'efficacia<sup>190,191</sup>.

Tecniche per la determinazione del genotipo virale sono attualmente disponibili e vengono principalmente impiegate per studi epidemiologici condotti con l'obiettivo di valutare la diffusione globale dei genotipi di HBV. Secondo alcuni autori l'identificazione del genotipo virale potrebbe dare indicazioni per la scelta di un'eventuale terapia farmacologica e potrebbe essere impiegato come

marcatore di prognosi della malattia. Tuttavia, ad oggi, non è ancora del tutto chiaro l'effettivo ruolo del genotipo virale come fattore predittivo<sup>69,105,192</sup>.

A volte, oltre al genotipo si intende valutare la presenza di eventuali mutazioni nel genoma virale; in questo caso risulta necessario il sequenziamento diretto di HBV-DNA. Il sequenziamento può avvenire attraverso l'impiego di appositi test commerciali oppure attraverso clonaggio o amplificazione del genoma virale seguiti da sequenziamento con metodo Sanger. Negli ultimi anni è stata introdotta una nuova tecnica di sequenziamento di terza generazione, detta next generation sequencing (NGS), che riduce il tempo di manipolazione del campione e permette un approccio più fine, preciso e profondo, il cui risultato non solo consiste nel conoscere la sequenza nucleotidica del genoma virale sulla base della lettura di molteplici sequenze nucleotidiche d'interesse rilevate nel campione, ma permette anche una quantificazione relativa delle mutazioni virali presenti in un determinato campione. Infine, il sequenziamento e conseguente analisi filogenetica permettono la determinazione del genotipo virale<sup>190,191,193</sup>.

## Storia naturale dell'infezione

La storia naturale dell'infezione da HBV è strettamente correlata a diversi fattori: endemia dell'area geografica in cui vive il soggetto suscettibile, stato di immunocompetenza dell'ospite, biologia del virus e fattori contingenti quali co-infezioni, super-infezioni da altri virus e co-presenza di altri fattori epatotossici, ad esempio l'abuso di alcol.

Come schematizzato in Figura 21, l'infezione da HBV può avere esiti ampiamente differenti: circa nel 90% dei casi l'infezione decorre in maniera asintomatica, mentre circa il 10% delle infezioni acute presenta sintomatologia di intensità variabile. La maggior parte delle infezioni acute da HBV (circa 80-90%) si risolve con la produzione di anticorpi neutralizzanti contro il patogeno (anti-HBs) e meno dell'1% presenta esito fatale per epatite fulminante. Tuttavia, circa il 10-20% delle infezioni da HBV cronicizza. Un'infezione cronica determina l'insorgenza dello stato di "portatore sano" in circa l'80% dei casi, in cui l'istologia epatica è normale o con lievi lesioni e la funzionalità del fegato è conservata, mentre nel 20% circa dei casi un'epatite cronica persiste in maniera attiva con possibile sviluppo di complicanze epatiche gravi quali cirrosi ed epatocarcinoma, che conducono alla morte. Seppur con differenze legate all'area geografica ed a fattori individuali e virali, globalmente il 30% delle cirrosi ed il 53% degli epatocarcinomi sono attribuibili all'infezione da HBV. È stato stimato che circa il 2% delle epatiti B croniche annue evolvono in cirrosi, mentre l'incidenza del tumore epatico è dello 0.1% tra i portatori cronici asintomatici, dell'1% tra i sintomatici ed aumenta a 3-10% tra coloro che hanno sviluppato cirrosi<sup>194-196</sup>.

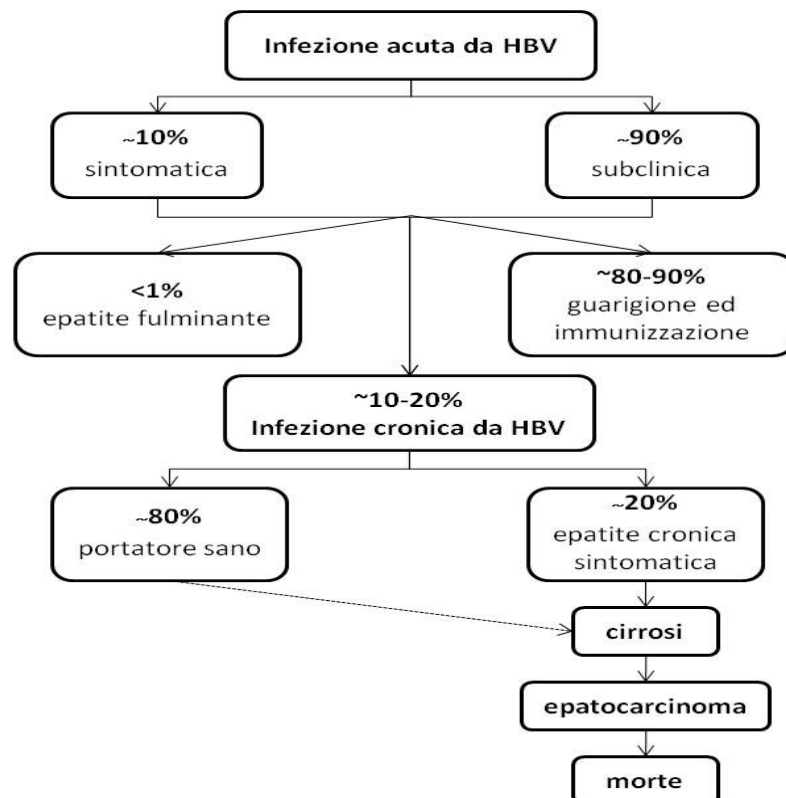


Figura 21: Storia naturale dell'infezione da HBV.

Il rischio di cronicizzazione dell'infezione da HBV, così come la sintomatologia, è strettamente legato all'età del contagio: minore è l'età in cui avviene il contagio e maggiore è la possibilità di avere un'infezione asintomatica che tende però a cronicizzare, con la possibilità di sviluppare gravi complicanze epatiche. Il rischio di cronicizzazione dell'infezione da HBV raggiunge il 90% nei neonati che contraggono l'infezione per via verticale, soprattutto se nati da madre HBeAg positiva, e si aggira intorno al 30-50% per i bambini infetti in età inferiore ai 5-6 anni. Nell'adulto l'infezione generalmente si risolve (95-99%); tuttavia, tra gli adulti con infezione cronica, vi è un 20-30% che sviluppa cirrosi ed epatocarcinoma<sup>2,153,197</sup>.

## **Infezione acuta**

In seguito al contagio, il virus penetra negli epatociti determinando la sintesi degli antigeni virali e la loro presentazione sulla membrana plasmatica delle cellule epatiche infette, scatenando la risposta immunitaria dell'ospite.

In alcuni casi, seppur rari, l'infezione di gran parte delle cellule epatiche in concomitanza con un'efficace, intensa e rapida risposta immunitaria espone il soggetto infetto al grave rischio di epatite fulminante.

Generalmente, dopo un periodo di incubazione di circa 2-3 mesi, nel corso di un'infezione acuta sono rilevabili in circolo HBsAg, anti-HBc IgM e HBV-DNA.

Nel momento in cui inizia la replicazione virale esponenziale è possibile identificare anche HBeAg ed in alcuni individui compaiono i primi sintomi. Tuttavia, in molti casi, nonostante l'assenza di sintomatologia, l'intensa replicazione virale porta all'identificazione di elevate cariche virale ed a un'infezione del 70-100% degli epatociti.

In fase di risoluzione dell'infezione la carica virale diminuisce e possono essere rilevati gli anticorpi anti-HBe. La guarigione di un'epatite acuta è caratterizzata dalla scomparsa di HBV-DNA e di HBsAg, con la comparsa in circolo degli anticorpi anti-HBs che conferiscono immunità a lungo termine<sup>158,198</sup> (Figura 22).

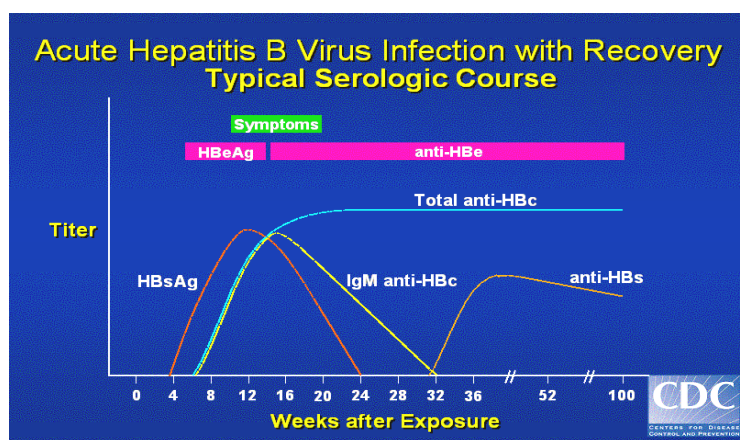


Figura 22: Corso sierologico di un'infezione acuta da HBV.

## Infezione cronica

Un'infezione da HBV viene definita cronica quando l'antigenemia per HBsAg perdura per più di sei mesi (Figura 23).

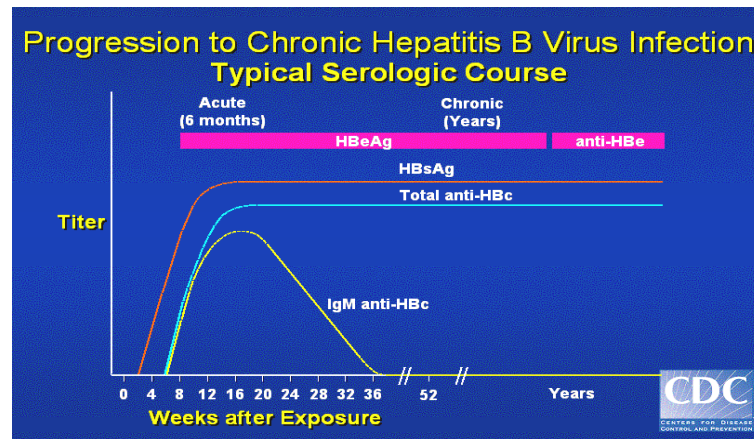


Figura 23: Corso sierologico di un'infezione cronica da HBV.

La storia naturale di un'infezione cronica da HBV può essere suddivisa in 4 fasi (Figura 24):

1. fase di immuno-tolleranza
2. fase di immunizzazione attiva (definita anche fase di immuno-eliminazione)
3. fase inattiva
4. fase di riattivazione oppure risoluzione dell'infezione<sup>194-197</sup>.

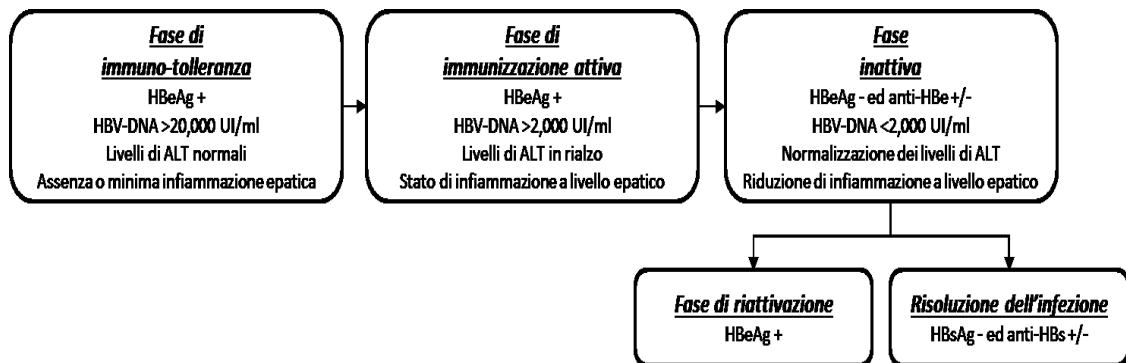


Figura 24: Fasi di un'infezione cronica da HBV.

La prima fase è caratterizzata da elevata replicazione virale con positività per HBeAg e concentrazione di HBV-DNA >20,000 UI/ml, che può anche raggiungere  $10^7$ - $10^9$  UI/ml. Risultano invece normali o lievemente alterati i livelli di ALT e, su biopsia epatica, si rileva assenza o minima presenza di infiammazione; infatti, in questa fase non è ancora attiva la risposta dei linfociti T dell'immunità adattativa dell'ospite. La fase di immuno-tolleranza può durare per oltre 30 anni con minima progressione della malattia, soprattutto se l'infezione viene acquisita alla nascita per via



perinatale; al contrario, in caso di infezione contratta da adulto questa fase può essere più corta o assente. Tuttavia, con il passare del tempo, la silente e prolungata attività replicativa di HBV porta ad un notevole aumento del rischio di sviluppare epatocarcinoma ed assai rari risultano i casi di sieroconversione ad anti-HBe.

La seconda fase dell'infezione cronica da HBV, denominata fase di immunizzazione attiva, è caratterizzata dalla positività per HBeAg e da un aumento dei livelli di ALT; le concentrazioni di HBV-DNA si mantengono elevate (HBV-DNA >2,000 UI/ml), seppur con una diminuzione della replicazione virale. In questa fase infatti si attiva la risposta dei linfociti T che riduce la concentrazione di HBV-DNA rispetto alla prima fase di immuno-tolleranza, pur mantenendo inalterata la capacità del patogeno di replicare. Con l'attivazione del sistema immunitario dell'ospite, a livello del fegato aumenta anche lo stato di infiammazione e con il passare degli anni si possono presentare serie complicanze epatiche.

Tuttavia, nel 10-20% dei casi si assiste alla sieroconversione di HBeAg che porta a tre possibili scenari:

- a) il 10-40% dei soggetti anti-HBe, in particolare se infetti da genotipo C o F, dopo un certo periodo ritornano ad essere HBeAg positivi, con malattia epatica subclinica;
- b) generalmente soggetti con elevate concentrazioni di ALT e di HBV-DNA (>20,000 UI/ml) restano in fase di immunizzazione attiva con continua replicazione virale pur risultando HBeAg negativi ed anti-HBe positivi, presentando un elevato rischio di insorgenza di cirrosi ed epatocarcinoma;
- c) in alcuni casi, la sieroconversione ad anti-HBe porta il soggetto alla successiva fase inattiva dell'infezione cronica da HBV.

La fase inattiva è caratterizzata dalla sieroconversione di HBeAg in anti-HBe seguita, generalmente, da una diminuzione della replicazione virale (che scende al di sotto delle 2,000 UI/ml) e dalla normalizzazione dei livelli di ALT. Anche l'infiammazione a livello epatico diminuisce e la fibrosi regredisce. I soggetti che passano alla fase inattiva dell'infezione cronica da HBV sono coloro che hanno avuto un'efficace attività linfocitaria di tipo T nei confronti del patogeno. Molti restano in fase inattiva per tutta la vita, altri per lunghi periodi, andando poi incontro nel migliore dei casi alla risoluzione dell'infezione oppure nel peggiore dei casi alla riattivazione.

La risoluzione dell'infezione da HBV è caratterizzata dalla scomparsa di HBsAg in circolo (0.5-1% dei casi), con eventuale comparsa di anti-HBs. Tuttavia, i soggetti che vanno incontro a questo quadro sierologico devono essere monitorati nel tempo, poiché infezioni croniche caratterizzate da basse cariche virali (<200 UI/ml) in assenza di HBsAg in circolo sono state osservate e descritte con il nome di "infezioni occulte da HBV" (OBI). Questo particolare tipo di infezione cronica da HBV è stata recentemente identificata come possibile importante fattore di rischio per l'insorgenza di carcinoma epatocellulare<sup>179,180,199</sup>.

Infine, circa il 20-30% dei soggetti in fase inattiva ritorna ad essere HBeAg positivo, presentando periodi alternati di riattivazione della replicazione virale ed inattivazione dell'infezione. Questa alternanza di fasi può persistere per tutta la vita conducendo allo sviluppo di cirrosi ed epatocarcinoma<sup>194-197</sup>.

Diversi sono i fattori di rischio associati allo sviluppo di severe complicanze epatiche (cirrosi ed epatocarcinoma) a seguito di cronicizzazione di un'infezione da HBV<sup>195,197,200</sup> (Figura 25). In particolare:

- fattori sociali ed ambientali → abuso di alcool, fumo ed esposizione ad aflatossine
- fattori demografici → genere maschile, età superiore ai 40 anni e storia familiare di tumore epatico
- fattori virali → infezione da ceppi di HBV di genotipo C, D o F, infezioni da mutanti virali nella regione pre-C/C, carica virale >20,000 UI/ml in soggetti di età superiore ai 40 anni e co-infezioni con altri virus HIV, HCV o HDV.

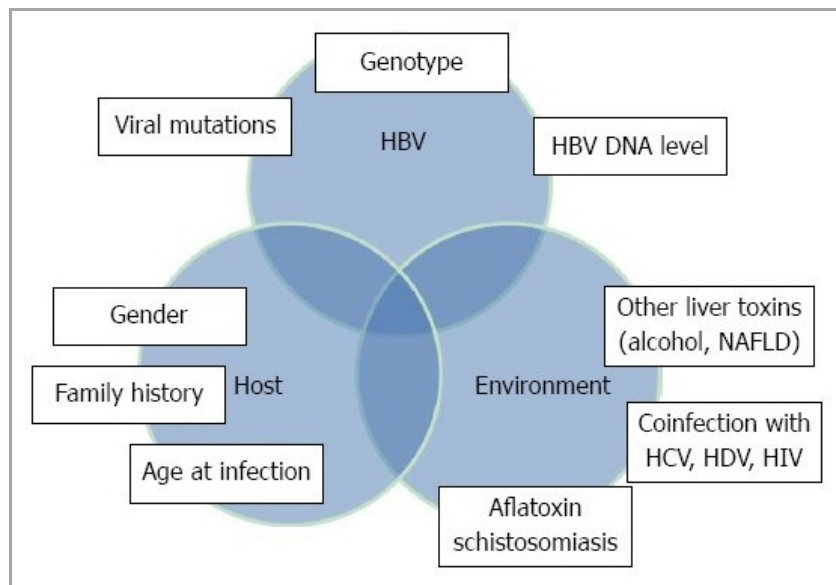


Figura 25: Fattori di rischio che influenzano la storia naturale di un'epatite B cronica.

## Epidemiologia

### Epidemiologia mondiale

L'epatite virale di tipo B rappresenta a tutt'oggi un rilevante problema di sanità pubblica a livello mondiale essendo una delle principali cause di malattia epatica acuta e cronica, tra cui cirrosi e carcinoma epatocellulare, considerato la terza causa di morte per tumore. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) stima che 2 miliardi di persone, ovvero un terzo della popolazione globale, si sono infettate con HBV, circa 240 milioni di individui (circa 3% della popolazione mondiale) sono portatori cronici del patogeno ed ogni anno sono più di 686,000 i morti per sequele acute o croniche legate a questa infezione virale<sup>2</sup>.

La diffusione dell'infezione da HBV viene valutata in base alla sieroprevalenza per HBsAg, la quale risulta molto variabile a livello mondiale. Una recente revisione sistematica ha raccolto i dati di sieroprevalenza per HBsAg da 1,800 lavori pubblicati tra il 1965 ed il 2013 provenienti da 161 Paesi e comprendenti 109,415,627 individui<sup>201</sup>. Globalmente la prevalenza di HBsAg risulta del 3.61%, con valori che oscillano tra lo 0.01% in Norvegia e Regno Unito e più del 20% nel Sudan meridionale (22.38%) e nelle Kiribati (22.70%).

In base alla diffusione di HBsAg si possono individuare 4 livelli di endemicità (Figura 26):

- bassa → prevalenza di HBsAg <2%
- intermedia-bassa → prevalenza di HBsAg 2%-4.99%
- intermedia-alta → prevalenza di HBsAg 5%-7.99%
- alta → prevalenza di HBsAg ≥8%.

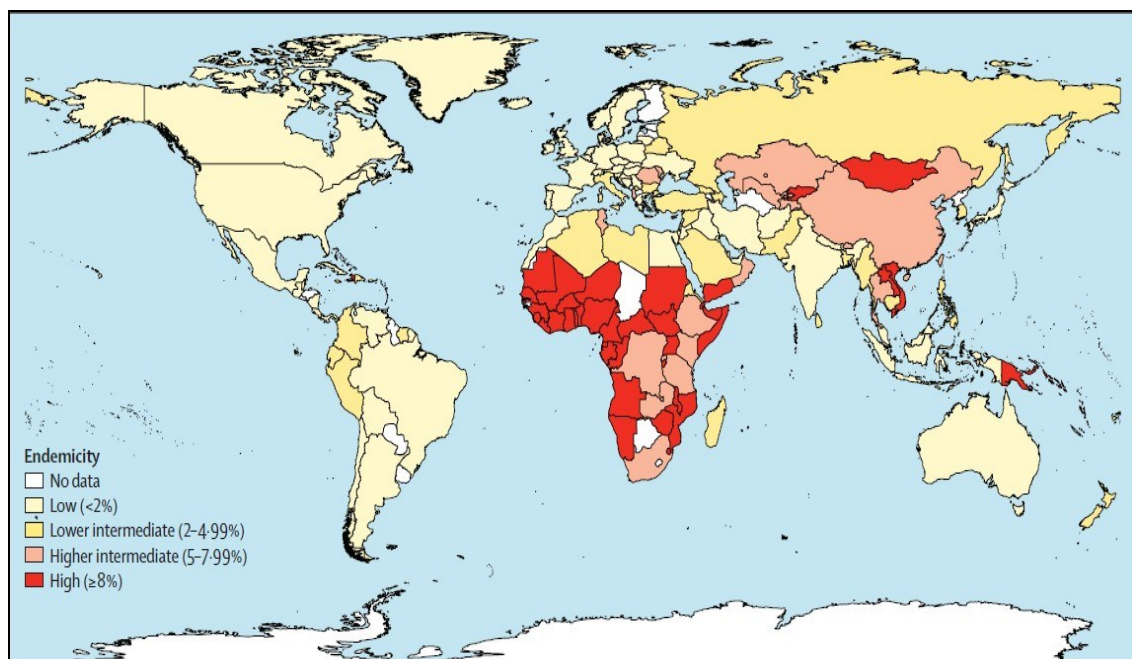


Figura 26: Endemicità per HBsAg a livello mondiale (1957-2013).

In Africa, fatta eccezione per Algeria (2.89%), Eritrea (2.49%) ed isole Seychelles (0.48%), la maggior parte dei paesi ha endemicità alta o intermedia-alta<sup>201</sup>.

Nelle Americhe, la maggior parte delle nazioni presenta bassa endemia, come ad esempio Messico (0.20%), Guatemala (0.22%) ed USA (0.27%); alcuni paesi hanno un'endemicità intermedia-bassa, come Colombia (2.29%) Giamaica (3.76%) e Repubblica Dominicana (4.09%), mentre alte percentuali di prevalenza per HBsAg vengono riscontrate ad Haiti (13.55%)<sup>201</sup>.

La regione del Mediterraneo orientale ha endemia intermedia-bassa, fatta eccezione per Somalia (14.77%) e Sudan (9.76%)<sup>201</sup>. Stesso livello di endemicità viene riscontrato nella regione europea, seppur con un tendente aumento della prevalenza per HBsAg da occidente ad oriente (0.01% Norvegia e Regno Unito, 2.52% Italia, mentre 7.38% Moldavia e 7.79% Albania)<sup>201</sup>.

Il sud-est asiatico è caratterizzato da endemia intermedia, bassa o alta, mentre prevalenze di HBsAg inferiori a 2 vengono rilevate solo in India (1.46%), Indonesia (1.86%) e Nepal (0.82%)<sup>201</sup>.

La regione del Pacifico occidentale ha un'endemicità intermedia-alta, con paesi che raggiungono livelli di HBsAg superiori a 8%, ad esempio Papua Nuova Guinea (14.59%), arcipelago delle isole Solomone (18.83%) ed isole Kiribati (22.70%); bassa endemia viene invece riscontrata in grandi nazioni come Australia (0.37%) e Malaysia (0.74%)<sup>201</sup>.

Globalmente, è stato stimato che il maggior numero di individui con infezione da HBV risiede nella regione del Pacifico occidentale (più di 95 milioni di individui), seguita dai paesi africani (più di 75 milioni); i tre Paesi con il più elevato numero di portatori di HBsAg sono Cina (74 milioni), India (17 milioni) e Nigeria (15 milioni). Le Americhe, invece, hanno il minor numero di soggetti infetti (più di 7 milioni)<sup>201</sup>.

È stato inoltre osservato che a livello mondiale la prevalenza di HBsAg è diminuita nel tempo e tale riduzione è avvenuta soprattutto nei periodi 1957-1989 e 1990-2013. Tuttavia, un'ampia diffusione dell'infezione persiste nei Paesi più poveri del pianeta ed addirittura in alcune di queste aree i valori di prevalenza tendono ad aumentare rispetto al passato<sup>201</sup>.

### *Epidemiologia in Europa*

Il WHO stima che nella regione europea sono circa 13 milioni le persone cronicamente infette da HBV e circa 60,000 persone all'anno muoiono per le gravi conseguenze epatiche HBV-correlate<sup>202</sup>.

I dati europei più recenti pubblicati dal Centro Europeo per la Prevenzione ed il Controllo delle Malattie (ECDC, European Centre for Disease prevention and Control) risalgono al 2014 e riportano complessivamente 22,442 casi di infezione da virus dell'epatite B (identificati come anti-HBc IgM e/o HBsAg e/o HBeAg e/o HBV-DNA positivi) notificati da 30 Stati Membri all'Unione Europea (EU/EEA),

con un tasso grezzo di 4.2 casi per 100,000 abitanti. L'11.9% di questi casi (2,667 casi ovvero 0.6 per 100,000 abitanti) sono stati classificati come infezioni acute da HBV (anti-HBc IgM e/o HBsAg e/o HBV-DNA positivo, con o senza sintomatologia), ed il 64.0% (14,371 casi ovvero 9.8 casi per 100,000 abitanti) come infezioni croniche (HBsAg e/o HBeAg e/o HBV-DNA positivo ed anti-HBc IgM negativo oppure positività per HBsAg e/o HBeAg e/o HBV-DNA in due test a distanza di 6 mesi l'uno dall'altro); non è stato invece possibile classificare la restante quota di casi segnalati (5,404 casi)<sup>203</sup>.

L'incidenza delle infezioni acute oscillava tra 0.0 casi per 100,000 abitanti a Malta a 3.2 in Bulgaria<sup>203</sup> (Figura 27), mentre per le infezioni croniche sono stati rilevati tassi che variavano da 0.1 casi per 100,000 abitanti in Romania a 17.3 in Svezia. Nel periodo 2006-2014 si è assistito complessivamente ad un costante declino dei casi acuti di HBV per tutti i Paesi, mentre il tasso di infezioni croniche è aumentato da 5.7 casi per 100,000 abitanti nel 2006 a 9.8 nel 2014<sup>203</sup> (Figura 28).

Nei maschi è stato rilevato un tasso d'infezione superiore rispetto a quello delle femmine (5.1 per 100,000 abitanti nei maschi vs. 3.3 per 100,000 abitanti nelle femmine), con valori maggiori per quanto riguarda i casi acuti rispetto ai cronici<sup>203</sup>.

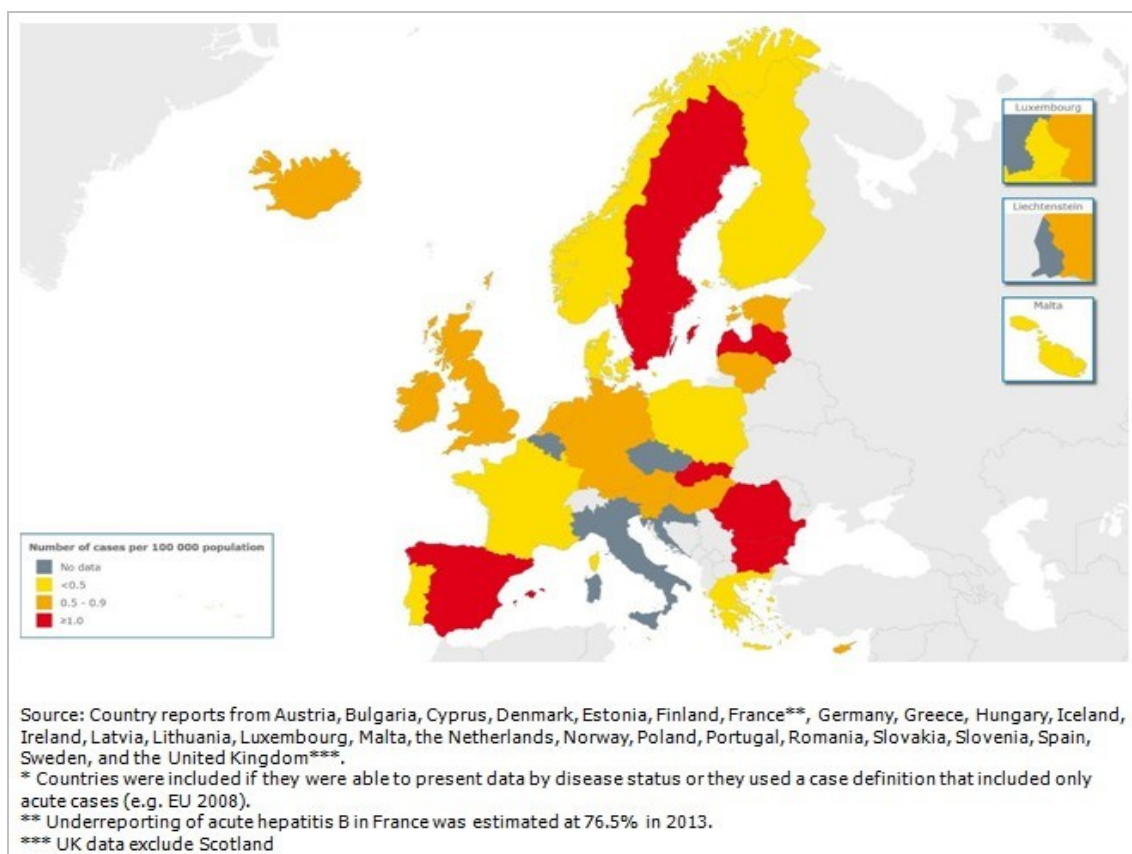


Figura 27: Casi di epatite B acuta per 100,000 abitanti in Europa nel 2014.

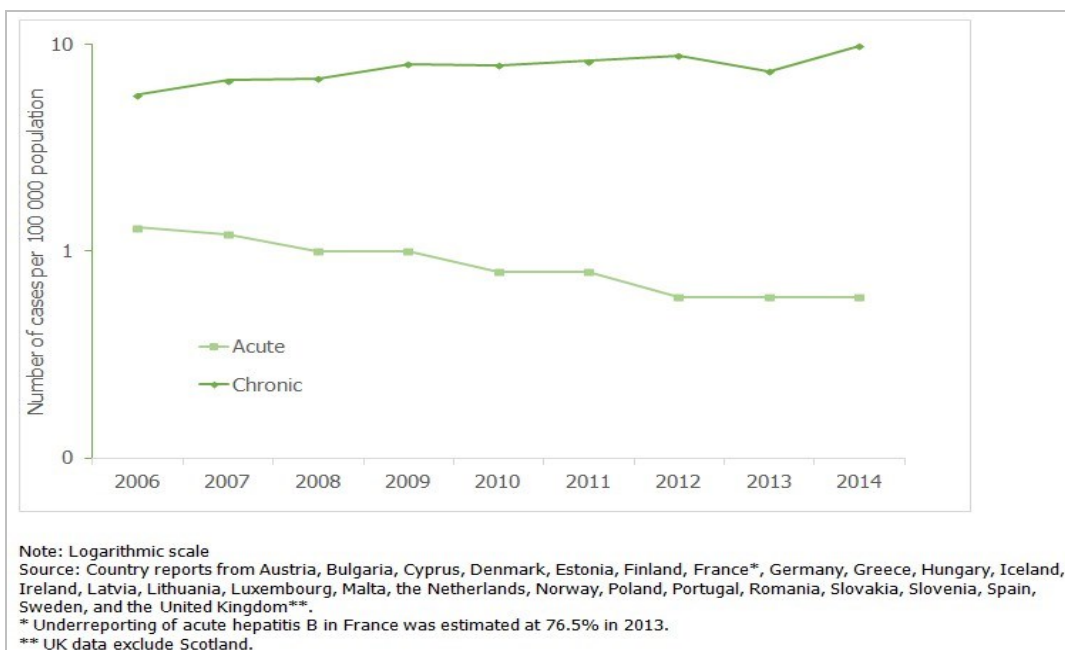


Figura 28: Casi di epatite B acuta e cronica per 100,000 abitanti in Europa nel periodo 2006-2014.

Per entrambi i tipi di infezione la fascia d'età più colpita era il gruppo 25-34 anni, corrispondente al 33.8% dei casi totali. Le distribuzioni dell'età erano simili tra i casi acuti e cronici segnalati (Figura 29). Degna di nota è la diminuzione della proporzione sia di casi acuti che cronici nel sottogruppo di soggetti con età <25 anni poiché si è passati da valori rispettivamente pari a 26.8% e 21.4% nel 2006 a 13.5% e 11.9% nel 2014<sup>203</sup>.

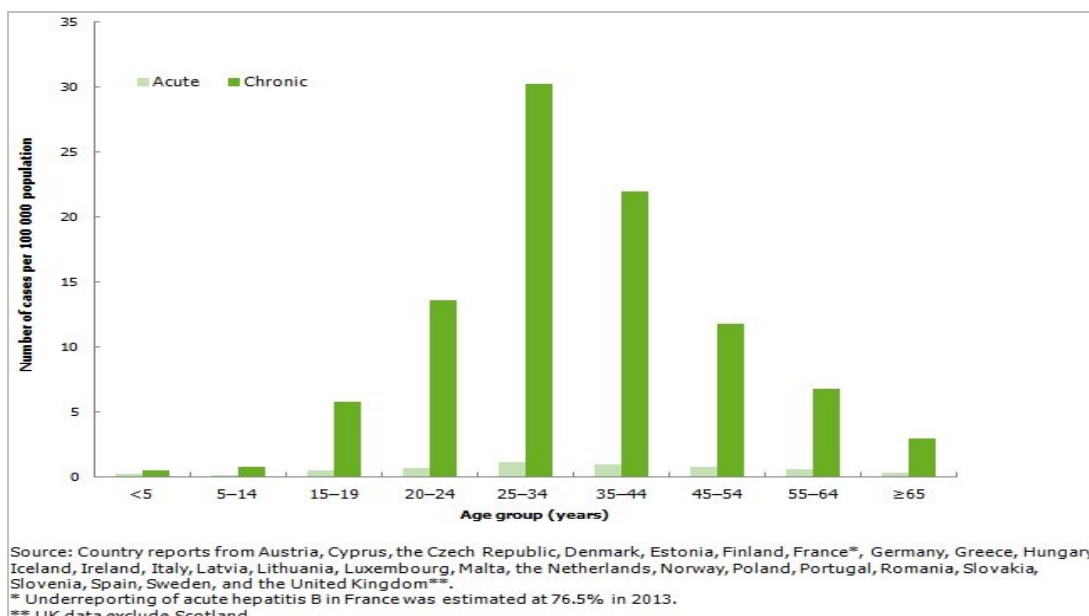


Figura 29: Casi di epatite B acuta e cronica per 100,000 abitanti suddivisi per fasce d'età in Europa nel 2014.

La via sessuale è risultata essere la principale via di trasmissione dell'infezione acuta, seguita dalla trasmissione per via nosocomiale. La trasmissione verticale perinatale è risultata invece la principale via di trasmissione dell'infezione cronica<sup>203</sup> (Figura 30).

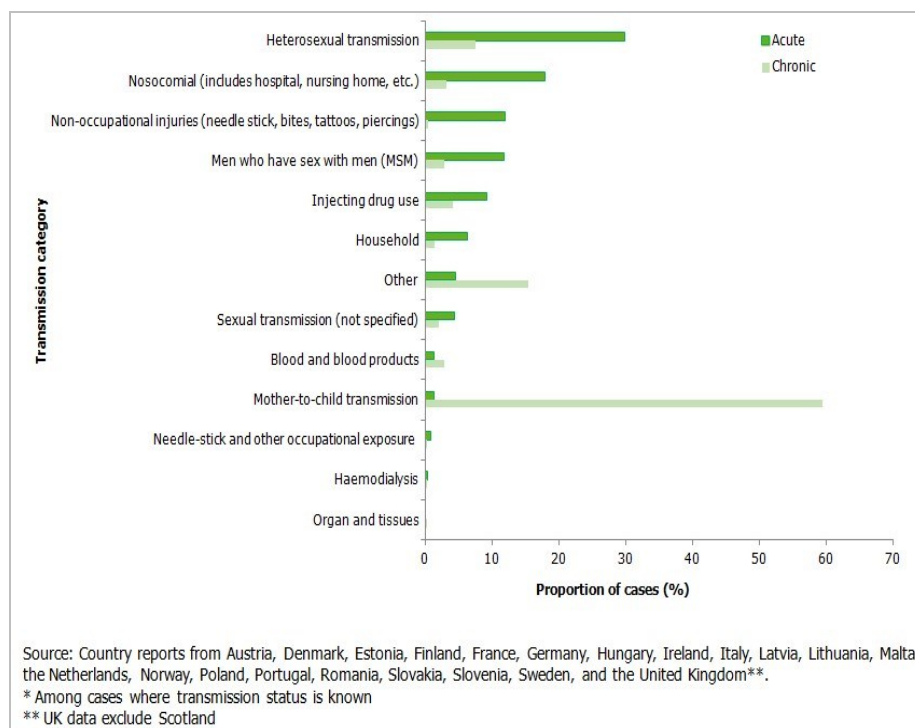


Figura 30: Vie di trasmissione dei casi di epatite B acuta e cronica per 100,000 abitanti in Europa nel 2014.

### Epidemiologia in Italia

L'Italia è una nazione ad endemicità intermedio-bassa per HBV, riportando un valore di sieroprevalenza per HBsAg di 2.52% (IC95% 2.49-2.54) nel periodo 1965-2013<sup>201</sup>.

Fino al 2009, le infezioni da HBV hanno mostrato una costante riduzione dell'incidenza mentre negli ultimi anni il SEIEVA (Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta) ha registrato una stabilizzazione dei tassi intorno a 1.0 caso per 100,000 abitanti e, secondo l'ultimo dato disponibile inerente all'anno 2015, l'incidenza è stata di 0.6 casi per 100,000 abitanti, suddiviso nelle varie fasce d'età in 0.1 per la classe d'età 0-14 anni, 0.3 per 15-24 anni, 0.8 per  $\geq 25$  anni (Figura 31). L'esistenza di un ulteriore reale trend in diminuzione andrà tuttavia verificato nei prossimi anni<sup>204</sup>.

Il maggiore decremento dell'incidenza delle infezioni da HBV è avvenuto a seguito dell'introduzione della vaccinazione universale anti-epatite B, iniziata nel 1983 per i gruppi a rischio e divenuta obbligatoria nel 1991 per tutti i nuovi nati e per i dodicenni. Di conseguenza, come mostrato in Figura 31 nel periodo 1985-2015 la diminuzione dell'incidenza ha riguardato soprattutto la fascia d'età 15-24 anni (verosimilmente grazie alla vaccinazione nei dodicenni). Oggi i soggetti che sviluppano epatite B sono soprattutto maschi (75.3%) e la classe d'età maggiormente interessata è compresa tra 35 e 54 anni (63.8%). Anche in questi soggetti a rischio è stato, tuttavia, registrato un calo del tasso di incidenza dell'infezione, attualmente pari a 1.4 casi per 100,000 abitanti<sup>204</sup>.

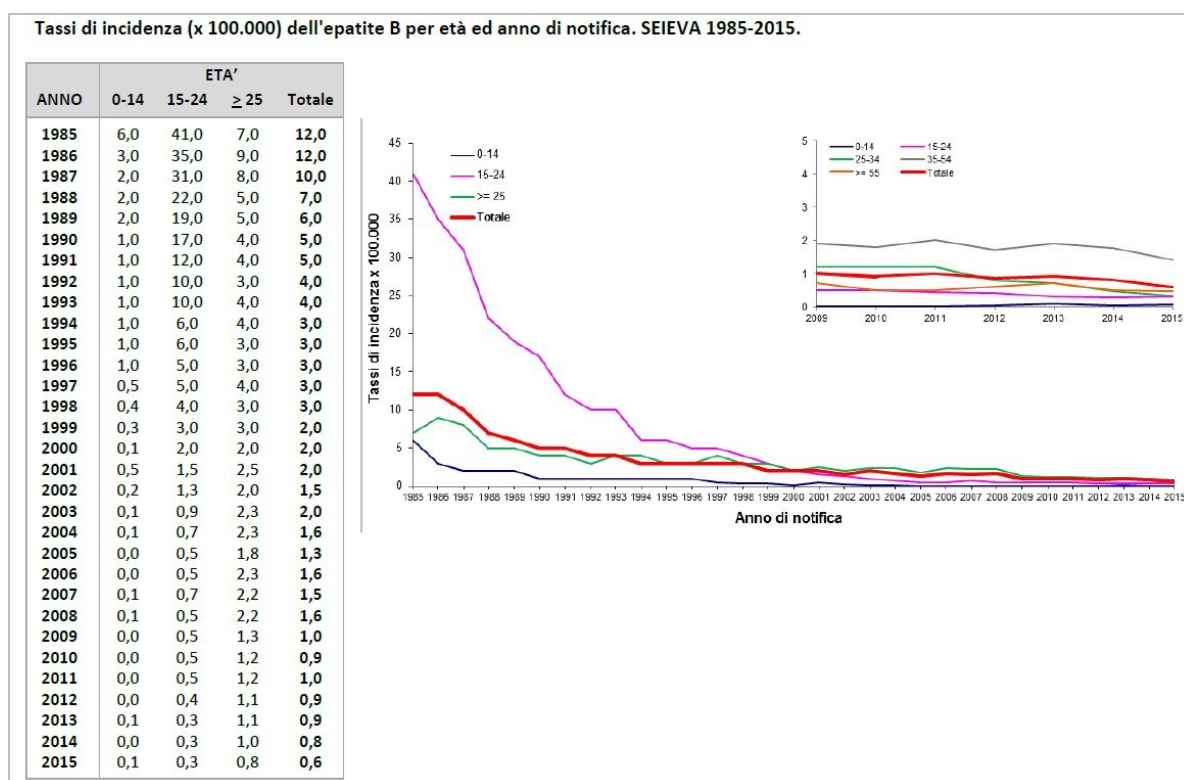


Figura 31: Incidenza dell'infezione da HBV in Italia per età ed anno di notifica nel periodo 1985-2015.

La trasmissione dell'infezione da HBV è maggiormente legata alla via percutanea mediante trattamenti cosmetici o terapie odontoiatriche e alla via sessuale mediante rapporti non protetti<sup>204</sup> (Figura 32).

Infine, vi è da notare che negli ultimi 5 anni circa il 19% delle nuove infezioni da HBV in Italia ha riguardato migranti provenienti da aree ad alta endemia, in particolare Europa orientale (9% dei casi di epatite B acuta notificati al SEIEVA) e paesi africani (4.9% dei casi)<sup>204</sup>.



Casi\* notificati di Epatite B con fattore di rischio identificato. SEIEVA 2015.

Fattore di rischio	0-14		15-24		25-34		35-54		55+		TOTALE	
	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%
Trasfusione sangue	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	1,2	3	4,8	5	1,9
Interventi chirurgici	0	0,0	0	0,0	1	4,8	22	13,3	6	9,7	29	10,9
Ospedalizzazione	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	1,2	0	0,0	2	0,8
Altre esposizioni parenterali**	0	0,0	2	15,4	4	19,1	48	28,6	22	35,5	76	28,5
Terapia odontoiatrica	1	33,3	1	8,3	8	38,1	65	38,0	19	31,2	94	35,1
Uso di droghe E.V.	0	0,0	0	0,0	2	10,0	11	6,6	0	0,0	13	4,9
Convivente tossicodipendente	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	1,2	0	0,0	2	0,8
Contatto con itterico nei 6 mesi	0	0,0	0	0,0	1	7,7	9	6,0	3	5,8	13	5,7
Partner sessuali (>1 nell'ultimo anno)	0	0,0	2	40,0	3	18,8	42	38,9	11	31,4	58	35,2
Convivente di soggetto HBsAg+	1	33,3	0	0,0	2	13,3	11	8,2	1	2,3	15	7,4
<b>TOTALE CASI***</b>	<b>3</b>		<b>14</b>		<b>22</b>		<b>183</b>		<b>65</b>		<b>287</b>	

\* I casi possono avere più di un fattore di rischio  
 \*\* Piercing, tatuaggi, agopuntura, manicure/pedicure, rasatura dal barbiere  
 \*\*\* Per alcuni casi l'informazione relativa ad alcuni fattori di rischio non è disponibile

Figura 32: Fattori di rischio associati all'infezione da HBV in Italia (dati SEIEVA 2015).

## Terapia

L'epatite B acuta non richiede una terapia specifica poiché si risolve spontaneamente in più del 95% degli adulti immunocompetenti; tuttavia è possibile un trattamento degli eventuali sintomi (nausea e vomito) al fine di garantire confort ed adeguato bilancio nutrizionale.

L'epatite B cronica, invece, può essere trattata con farmaci anti-virali somministrati per via orale o parenterale. I farmaci anti-virali impiegati contro HBV mirano alla soppressione della replicazione virale al fine di prevenire l'insorgenza o la progressione della fibrosi e della cirrosi, riducendo di conseguenza l'incidenza del carcinoma epatocellulare.

Ad oggi gli agenti anti-virali disponibili per il trattamento dell'epatite B cronica sono sette: due formulazioni dell'interferone  $\alpha$ , standard (IFN- $\alpha$ ) e peghilato (PEG-IFN- $\alpha$ ), e cinque analoghi nucleosidici o nucleotidici (NA), ovvero lamivudina (LAM), telbivudina (LdT), entecavir (ETV), adefovir dipivoxil (ADV) e tenofovir disoproxil fumarato (TDF)<sup>205-207</sup>.

Le proprietà farmacologiche, il meccanismo d'azione e la via di somministrazione dei vari anti-virali sono molto differenti.

L'interferone viene somministrato mediante iniezione subcutanea; si tratta di una citochina, quindi non solo possiede attività anti-virale, ma ha anche un effetto immuno-modulatore in quanto stimola l'attività dei linfociti T e di conseguenza la maturazione dei linfociti B. Studi hanno dimostrato che, circa 6 mesi dopo la fine di un anno di trattamento con PEG-IFN- $\alpha$ , il 29-32% dei pazienti HBeAg positivi sierocverte, il 3-7% risulta HBsAg negativo e/o anti-HBs positivo ed il 7-14% dei soggetti presenta una riduzione della carica virale al di sotto delle 400 copie/ml<sup>208,209</sup>; per quanto riguarda invece i soggetti HBeAg negativi, dopo 3 anni dal termine del trattamento di 12 mesi, è stata osservata una normalizzazione dei valori degli enzimi epatici ed una riduzione della carica virale al di sotto delle  $10^3$  UI/ml nel 25% circa dei casi, inoltre in circa il 9% dei soggetti si è assistito alla perdita di positività per HBsAg<sup>210</sup>. Le organizzazioni internazionali per lo studio del fegato e delle malattie epatiche considerano l'interferone un farmaco di prima linea per il trattamento dell'epatite B cronica; tuttavia il suo impiego presenta vantaggi e svantaggi: si tratta di un anti-virale privo di farmaco-resistenze, ma, poiché somministrato per via iniettiva, ha svariati effetti collaterali e quindi non può essere utilizzato per terapie a lungo termine<sup>205-207</sup>.

Risultano invece di più semplice impiego gli analoghi nucleosidici/nucleotidici in quanto somministrati per via orale e con limitati effetti collaterali, anche a seguito di trattamento prolungato. Tutti gli NA, dopo somministrazione, vengono fosforilati ed agiscono sull'attività della DNA-polimerasi virale competendo con i deossinucleotidi trifosfati (dNTP) per l'incorporazione nella nuova molecola di DNA virale. Tuttavia, intervengono in processi diversi del ciclo replicativo: ad esempio ADV inibisce la trascrizione inversa, mentre LAM e TDF inibiscono la sintesi del filamento negativo di HBV-DNA<sup>206</sup>. Anche gli NA presentano però degli svantaggi, infatti nei confronti di questi anti-virali sono state sviluppate farmaco-resistenze che ne limitano l'impiego. Ad oggi i due NA considerati farmaci di prima linea per il trattamento dell'infezione cronica da HBV sono ETV e TDV in quanto agenti con potente attività anti-virale e scarsa farmaco-resistenza<sup>205-207</sup>. Evidenze scientifiche

dimostrano che dopo 4-5 anni di trattamento continuo con ETV o TDF più del 90% dei soggetti trattati presenta HBV-DNA <300-400 copie/ml, in circa il 20-40% dei soggetti HBeAg positivi si assiste a sieroconversione, mentre nell'1-3% dei casi si ha negativizzazione di HBsAg<sup>211-213</sup>. È stato, inoltre, osservato che una terapia prolungata con questi due farmaci può portare a regressione della fibrosi e della cirrosi ed una riduzione dell'incidenza di carcinoma epatocellulare<sup>214-217</sup>. Oltre a permettere il trattamento dell'infezione cronica da HBV e delle sue sequele, questi due anti-virali presentano scarse farmaco-resistenze: sono state descritte resistenze nei confronti di ETV solo nell'1.2% dei soggetti trattati a distanza di 5 anni dall'inizio della terapia, mentre non è stata osservata nessuna resistenza specifica nei confronti di TDF dopo 7 anni di trattamento<sup>150,218</sup>.

Nonostante l'esistenza di diversi farmaci anti-virali, al momento non vi sono ancora indicazioni univoche per il trattamento dei soggetti con infezione cronica da HBV. In generale, la terapia è rivolta a pazienti che presentano elevata replicazione virale ed infiammazione del fegato severa o moderata con eventuale fibrosi; quindi soggetti ad elevato rischio di progressione della malattia epatica verso la cirrosi ed il tumore<sup>205-207</sup>. Nella maggior parte dei casi gli anti-virali ad oggi disponibili per il trattamento dell'infezione da HBV permettono di migliorare la prognosi, la qualità della vita ed aumentare le possibilità di sopravvivenza; tuttavia necessitano una somministrazione prolungata o addirittura per tutta la vita poiché raramente permettono la completa guarigione dall'infezione. Essi infatti prevengono la replicazione virale, ma non eradicano completamente il genoma virale in quanto non sono in grado di eliminare le molecole di cccDNA virale e non inducono un adeguato controllo da parte del sistema immunitario. Ad oggi, nuove molecole sono in fase di studio poiché risultano necessari nuovi agenti anti-virali in grado di agire su tutte le fasi del ciclo cellulare, dall'ingresso del virus nella cellula al suo rilascio; in particolare sarebbero auspicabili nuovi farmaci con scarsi effetti collaterali capaci sia di degradare, silenziare o eliminare le molecole di cccDNA sia di modulare efficientemente il sistema immunitario dell'ospite infetto<sup>78</sup>.

## **Misure preventive**

Considerando la diffusione endemica di HBV a livello globale e la capacità del patogeno di instaurare un'infezione cronica difficile da curare completamente e spesso caratterizzata da severe complicanze epatiche che conducono alla morte, risulta necessario adottare adeguate misure di sanità pubblica al fine di evitare il contagio e prevenirne la trasmissione.

Oggigiorno la misura preventiva migliore per contrastare l'infezione da HBV risulta la vaccinoprofilassi attiva attuata mediante l'impiego di vaccini anti-HBV sicuri ed efficaci che conferiscono protezione a lungo termine nei confronti dell'agente patogeno.

Tuttavia, diverse sono le strategie di prevenzione che possono essere messe in atto per ridurre i fattori di rischio HBV-correlati e ridurre la possibilità di trasmissione dell'infezione. Tra tali misure è utile ricordare:

- campagne di sensibilizzazione ed educazione sanitaria sia per i soggetti infetti, sia per i soggetti a maggior rischio di esposizione (ad esempio personale sanitario), sia per l'intera popolazione al fine di aumentare la consapevolezza del rischio di esposizione ad HBV e di aumentare la conoscenza delle norme preventive da adottare per evitare un possibile contagio. Una di queste iniziative è il "World Hepatitis Day" organizzato dal WHO e celebrato a livello mondiale ogni anno il 28 Luglio<sup>219</sup>;
- adeguate norme igienico-sanitarie individuali e collettive ed idonee procedure di disinfezione dei luoghi a maggior rischio di esposizione al patogeno. Per quanto riguarda l'ambito ospedaliero, per prevenire una trasmissione occupazionale e/o nosocomiale, è opportuno l'uso dei dispositivi di protezione individuali, limitare la manipolazione di strumenti taglienti, provvedere alla disinfezione degli ambienti ed alla sterilizzazione degli strumenti chirurgici. Al di fuori dell'ambito ospedaliero risulta necessaria la sterilizzazione di tutti quegli strumenti impiegati per piercing, tattoo e trattamenti estetici, è inoltre opportuna un'adeguata pulizia degli ambienti familiari in presenza di portatore di HBV<sup>219,220</sup>;
- adeguate norme comportamentali al fine di evitare il rischio di esposizione, ad esempio in ambito sessuale risulta opportuno l'uso del profilattico soprattutto in caso di rapporti occasionali, multipli o con partner portatore di HBV; per i tossicodipendenti è necessario evitare lo scambio di siringhe ed aghi e preferire l'uso di tali oggetti monouso, per i conviventi di portatori di HBV è importante mantenere separati gli oggetti per la toilette personale che sono potenziali veicoli di trasmissione del patogeno<sup>219</sup>;
- screening dei donatori di sangue attuati mediante test sierologici e molecolari su tutte le sacche di sangue donato al fine di individuare l'eventuale presenza di marcatori di infezione e quindi provvedere all'esclusione dalla donazione del materiale infetto<sup>156</sup>;

- screening delle donne gravide per HBsAg al terzo trimestre di gravidanza al fine di individuare le madri portatrici del patogeno ed attuare adeguate misure preventive di immunizzazione attiva/passiva per il nascituro al momento del parto<sup>221</sup>;
- profilassi post-esposizione da attuare quando vi è un rischio elevato ed effettivo di possibile contagio; consiste nell'immunizzazione passiva del soggetto entrato in contatto con il virus mediante la somministrazione di specifiche immunoglobuline (HBIGs) contenenti anticorpi contro HBsAg ad elevato titolo. Le HBIGs conferiscono protezione immediata ma limitata nel tempo; vengono somministrate ai neonati nati da madre HBsAg positiva (generalmente entro le prime 24 ore di vita in associazione con l'immunizzazione attiva mediante vaccino) ed ai soggetti che si sono esposti accidentalmente al patogeno per via parenterale (percutanea o mucosale) o per via sessuale<sup>221-223</sup>.

## **VACCINI E STRATEGIE VACCINALI ANTI-HBV**

I dati epidemiologici disponibili a livello mondiale sottolineano che l'epatite B è tutt'oggi un rilevante problema di sanità pubblica. La terapia anti-HBV, seppur efficace nel migliorare la prognosi e le condizioni di vita del soggetto infetto, spesso non porta ad una completa guarigione. Ad oggi l'unica vera arma disponibile per fronteggiare l'infezione da HBV, sia in termini di sicurezza che di costi, è la prevenzione attuabile attraverso la vaccinazione.

L'immunizzazione attiva contro HBV è possibile mediante la somministrazione di vaccini che, conferendo protezione a lungo termine nei confronti del patogeno, non solo prevencono l'insorgenza dell'infezione, ma globalmente hanno drasticamente ridotto l'incidenza delle gravi sequele epatiche HBV-correlate.

### **Vaccini anti-HBV**

Vaccini sicuri ed efficaci contro HBV sono disponibili sul mercato dall'inizio degli anni '80.

I primi vaccini anti-HBV sono definiti vaccini di prima generazione o vaccini plasma-derivati. Sperimentati per la prima volta nel 1970 e messi in commercio tra il 1981 ed il 1982, si tratta di composizioni immunogene contenenti particelle sferiche di HBsAg di 22 nm di diametro purificate a partire dal plasma di portatori cronici dell'antigene ed inattivate mediante una combinazione di procedure fisiche e biologiche caratterizzate dall'impiego di urea, pepsina, formaldeide e calore. Diversi trial clinici hanno dimostrato che i vaccini plasma-derivati sono sicuri, immunogeni ed efficaci nel prevenire l'infezione da HBV ed in grado di garantire protezione a lungo termine<sup>224-230</sup>. Dall'inizio della loro commercializzazione sono stati somministrati con successo a diversi milioni di individui; tuttavia la difficoltà di raccolta del materiale di partenza e la complessità nella produzione e nei controlli ne hanno impedito la vaccinazione su larga scala. Oggigiorno queste composizioni vaccinali non sono più disponibili in Nord America ed Europa, ma sono ancora utilizzate in alcune zone dell'Asia ed in India.

Pochi anni dopo l'introduzione dei vaccini plasma-derivati, lo sviluppo dell'ingegneria genetica ha portato alla realizzazione di nuovi vaccini anti-HBV definiti di seconda generazione<sup>231</sup>. Si tratta di composizioni vaccinali costituite dall'antigene di superficie del virus ottenuto mediante la tecnologia del DNA ricombinante, ovvero con l'impiego di cellule eucariote transfettate da plasmidi contenenti la porzione genica codificante la proteina S minore dell'envelope virale. Per la produzione di questi vaccini la sequenza nucleotidica corrispondente ad HBsAg viene inserita in un plasmide fiancheggiata da specifici segnali di trascrizione attivi in cellule di lievito. Il plasmide viene, quindi, trasferito all'interno di cellule di lievito, in particolare *Saccharomyces cerevisiae*, e tali cellule transfettate vengono fatte fermentare al fine di permettere l'espressione di HBsAg. Le cellule vengono poi frammentate per ottenere il rilascio dell'antigene, il quale viene purificato dalle altre componenti del lievito attraverso diverse tecniche di separazione fisica (ad esempio filtrazione e cromatografia). Infine, la proteina HBsAg si auto-assembla in strutture sferiche di circa 22 nm, simili alle particelle presenti nel plasma dei portatori di HBV, risultando pienamente immunogena<sup>232</sup>. I primi vaccini anti-HBV di seconda generazione sono stati commercializzati nel 1986 e fin da subito diverse

sperimentazioni cliniche ne hanno dimostrato la sicurezza, l'efficacia e l'immunogenicità comparabili a quelle dei precedenti vaccini plasma-derivati; inoltre, la loro produzione potenzialmente illimitata ne ha permesso l'impiego su larga scala tanto che tutt'oggi sono ampiamente utilizzati in tutto il mondo<sup>227, 233-236</sup>.

Il vaccino anti-HBV ottenuto con la tecnica del DNA ricombinante è attualmente disponibile sia in formulazioni monovalenti sia combinato con altri vaccini al fine di aumentare l'accettabilità della vaccinazione soprattutto tra le fasce d'età più piccole della popolazione. I vantaggi dei vaccini combinati consistono nella riduzione del numero di iniezioni, nella diminuzione dei costi complessivi per la vaccinazione e nella semplificazione della schedula vaccinale per i programmi di immunizzazione dell'infanzia<sup>237,238</sup>. Tra i principali vaccini combinati che contengono HBsAg vi sono i vaccini bivalenti contro i virus epatitici di tipo A e B i quali, pur avendo modalità di trasmissione diversa, hanno però un'epidemiologia mondiale ed una severità della patologia età-correlata che li accomuna; di conseguenza una somministrazione combinata porta a vantaggi per i programmi di controllo delle due malattie infettive in termini di convenienza, compliance e costi<sup>239-241</sup>. Altri importanti vaccini combinati sono gli esavalenti i quali permettono, con un'unica somministrazione, la protezione nei confronti di sei diverse malattie infettive quali epatite B, difterite, tetano, pertosse, poliomielite e malattie invasive causate da *Haemophilus influenzae* di tipo B.

In generale, è stato dimostrato che la risposta immune e la sicurezza dei vaccini combinati sono paragonabili a quelle osservate nelle rispettive composizioni monovalenti<sup>242-244</sup>. Ad oggi, tutti i vaccini anti-HBV presenti in commercio sono comparabili in termini di sicurezza ed immunogenicità tanto da poter essere impiegati in maniera intercambiabile. Qualora risulta necessaria la somministrazione alla nascita, il vaccino anti-HBV deve però avere una composizione monovalente<sup>245</sup>.

Nonostante tutti i vaccini anti-HBV, sia di prima che di seconda generazione, contengano come componente immunogena la proteina HBsAg, la sua concentrazione nelle diverse composizioni vaccinali varia da 2.5 a 40 µg per dose in base alla ditta produttrice e soprattutto alla popolazione target. In generale, il dosaggio pediatrico raccomandato corrisponde alla metà di quello dell'adulto, rispettivamente 5-10 µg e 10-20 µg di HBsAg per dose, invece concentrazioni più elevate (40 µg) vengono suggerite per l'immunizzazione di dializzati e soggetti immunocompromessi. Oltre alla componente immunogena, i vaccini anti-HBV contengono un adiuvante (generalmente alluminio fosfato o idrossido d'alluminio) che aiuta ad aumentare la risposta da parte del sistema immunitario. Tutti i vaccini anti-HBV vanno conservati a temperature comprese tra 2° e 8°C, evitando il congelamento che ne provoca il deterioramento irreversibile.

La composizione vaccinale viene inoculata per via intramuscolare, nella regione deltoidea per i ragazzi e gli adulti o nella faccia antero-laterale della coscia per i neonati e i lattanti; è stato infatti osservato che la diffusione del vaccino nel tessuto adiposo ne riduce la risposta anticorpale<sup>246</sup>.

Attualmente il WHO raccomanda che tutti i nuovi nati ricevano una dose di vaccino anti-HBV il prima possibile dopo la nascita (preferibilmente entro le prime 24 ore di vita), seguita da altre 2 (schedula vaccinale a tre dosi) o 3 (schedula vaccinale a 4 dosi) somministrazioni per completare un ciclo primario<sup>2</sup>. In generale una schedula vaccinale completa è costituita da 3 dosi di vaccino somministrate ai tempi 0, 1, 6 mesi; tuttavia il numero, i tempi di somministrazione e la popolazione

target possono variare in base alle indicazioni della ditta produttrice e soprattutto in base alle politiche vaccinali dei diversi Paesi<sup>246,247</sup>.

Nuovi vaccini anti-HBV, definiti di terza generazione, sono stati sviluppati a partire dagli anni '90. Si tratta di composizioni vaccinali che oltre a contenere HBsAg contengono una o entrambe le proteine pre-S (pre-S1 e pre-S2) dell'envelope virale. Come i vaccini di seconda generazione, anche questi vaccini vengono prodotti mediante la tecnica del DNA-ricombinante, ma per l'espressione delle componenti antigeniche vengono transfettate cellule di mammifero. Nonostante la presenza delle proteine pre-S sembra aumentare l'immunogenicità di queste composizioni vaccinali rispetto ai tradizionali vaccini derivanti dal lievito, ad oggi la loro produzione risulta costosa ed il loro impiego ancora limitato<sup>248-250</sup>.

### **Sicurezza, efficacia ed immunogenicità dei vaccini anti-HBV**

Dalla loro introduzione in commercio, diverse centinaia di milioni di dosi di vaccino anti-HBV sono state somministrate in tutto il mondo con straordinari risultati in termini di sicurezza ed efficacia.

Il vaccino anti-HBV è ben tollerato: le reazioni avverse generalmente sono lievi, transitorie e limitate al sito di iniezione, quali ad esempio arrossamento, gonfiore o indurimento; infrequenti, lievi ed auto-limitanti sono invece le reazioni avverse sistemiche quali fatica, febbre, emicrania, nausea e dolore addominale<sup>245</sup>.

Raramente sono stati riportati casi di eventi avversi severi con insorgenza di disordini neurologici. In particolare, nel 1998 in Francia è stata avanzata l'ipotesi che la vaccinazione anti-HBV potesse essere collegata all'insorgenza di casi di sclerosi multipla o altre malattie demielinizzanti come la sindrome di Guillain-Barré; tuttavia non è stato riscontrato nessun nesso causale tra la vaccinazione e l'insorgenza di tali patologie. La vaccinazione anti-HBV è stata inoltre associata alla possibilità di insorgenza di malattie autoimmuni (come artrite reumatoide e lupus eritematoso sistemico), diabete mellito, leucemia linfoblastica acuta, sindrome da fatica cronica e persino perdita di capelli; anche in questo caso non è stata però riscontrata nessuna chiara relazione causale<sup>251-258</sup>.

La vaccinazione anti-HBV può essere somministrata senza problemi a donne gravide ed allattanti; l'unica controindicazione riguarda l'ipersensibilità a qualsiasi componente del vaccino<sup>245</sup>.

I vaccini anti-HBV risultano efficaci nel prevenire l'infezione in quanto stimolano il sistema immunitario del soggetto a produrre specifici anticorpi neutralizzanti che agiscono in caso di esposizione al virus. Poiché tutti i vaccini anti-HBV contengono la proteina HBsAg, i soggetti immunizzati sviluppano specifici anticorpi neutralizzanti anti-HBs diretti contro il determinante *a*, conferendo protezione nei confronti di tutti i genotipi virali. In particolare, viene universalmente considerata protettiva una concentrazione di anticorpi anti-HBs circolanti uguale o superiore a 10 UI/l<sup>183</sup>. Dopo un ciclo vaccinale primario completo (3 dosi di vaccino somministrate rispettivamente ai tempi 0, 1, 6 mesi), quasi il 100% dei soggetti immunizzati sieroconverte, cioè sviluppa anticorpi anti-HBs rilevabili in circolo; in particolare circa il 95% degli adulti e quasi il 100% dei bambini risulta sieroprotetto, ovvero presenta un titolo anticorpale protettivo (anti-HBs  $\geq$  10 UI/l)<sup>226,235,259-261</sup>. Un



soggetto che al termine di un ciclo vaccinale primario completo (a distanza di 1-2 mesi dalla terza dose) presenta titolo anticorpale  $<100$  UI/l è definito ipo-responder, mentre se non sviluppa un titolo anticorpale protettivo (anti-HBs  $<10$  UI/l) viene definito non-responder (circa 5% dei soggetti immunocompetenti)<sup>261</sup>.

La risposta alla vaccinazione è influenzata da diversi fattori quali età (soprattutto soggetti  $>40$  anni di età), stili di vita (forte fumatore, abuso di alcool) e fattori genetici (sesso, obesità), ma anche stato immunitario (condizioni di immunosoppressione ad esempio per infezione da HIV o per trapianto oppure condizioni di alterazione del sistema immunitario come nel caso della celiachia) e malattie croniche (diabete mellito, malattie croniche epatiche o renali). Si tratta di particolari condizioni che portano il soggetto ad avere una risposta sub-ottimale al vaccino o addirittura a risultare non-responder<sup>262-264</sup>.

Per i soggetti immunocompromessi, a causa di infezione da HIV o terapia immunosoppressiva, e per gli emodializzati è stato osservato che un aumento della concentrazione di HBsAg nel vaccino (40  $\mu$ g) e/o una schedula vaccinale modificata con più dosi di vaccino in tempi ravvicinati (4 dosi di vaccino somministrate al tempo 0, 1, 2 e 6 mesi) permette un'adeguata protezione nei confronti di HBV in una quota più elevata di soggetti<sup>265,266</sup>. In particolare, per i pazienti emodializzati e gli adulti di età superiore ai 40 anni un nuovo ciclo vaccinale completo o la somministrazione di dosi booster sembrano essere una soluzione per aumentare la percentuale di individui HBV-protetti<sup>267,268</sup>. Per i soggetti celiaci è stato invece osservato che una maggiore efficacia dell'immunizzazione anti-HBV possa essere raggiunta con l'iniezione del vaccino per via intradermica anziché intramuscolare e con la somministrazione di periodiche dosi booster (circa ogni 10 anni)<sup>269</sup>.

Infine, nuovi vaccini anti-HBV preparati con l'impiego di un nuovo adiuvante (AS04) si sono rivelati sicuri ed efficaci nell'aumentare l'immunogenicità in soggetti anziani, emodializzati, immunocompromessi e non-responder<sup>270-272</sup>. Allo stesso modo, negli ipo- o non-responder all'immunizzazione primaria convenzionale, negli immunocompromessi e nei soggetti con malattia renale cronica, è stato rilevato un incremento della risposta immunitaria con l'utilizzo di vaccini di terza generazione contenenti tutte le proteine S dell'envelope virale<sup>273-276</sup>.

Evidenze scientifiche dimostrano che la concentrazione di anticorpi anti-HBs indotti da vaccino diminuisce con il passare del tempo e la cinetica di tale decremento dipende dal picco anticorpale raggiunto a seguito di un ciclo vaccinale primario completo. In altre parole, maggiore è il titolo anticorpale post-immunizzazione primaria, più lunga sarà la persistenza in circolo degli anticorpi anti-HBs<sup>277-282</sup>. Tuttavia, livelli anticorpali non protettivi (anti-HBs  $<10$  UI/l) non implicano necessariamente una perdita di protezione nei confronti del patogeno, poiché a seguito di vaccinazione, oltre alla produzione di anti-HBs neutralizzanti (immunità umorale), vengono attivate le cellule T e B della memoria (immunità cellulare o memoria immunologica) in grado di conferire protezione a lungo termine nei confronti di un'eventuale esposizione al virus<sup>283-286</sup>.

Studi di follow up dimostrano che a distanza di diversi anni dalla vaccinazione, soggetti con titolo anticorpale  $<10$  UI/l hanno una rapida ed efficace risposta anamnesticca dopo somministrazione di una dose booster di vaccino o esposizione diretta al patogeno. L'immunità cellulare indotta da vaccino garantisce perciò protezione a lungo termine nei confronti di nuove infezioni acute (breakthrough infection) e nello sviluppo dello stato di portatore<sup>287-290</sup>.

Un continuo monitoraggio della persistenza di protezione umorale e/o cellulare indotta da vaccino nei confronti di HBV è però necessario e risulta particolarmente importante a seguito delle recenti osservazioni, principalmente provenienti dall'Asia, per cui anche la memoria immunologica tende a svanire dopo circa due decenni dall'immunizzazione primaria<sup>291-296</sup>.

Verso la fine degli anni '90 i vaccini anti-HBV monovalenti sono stati gradualmente sostituiti da composizioni vaccinali combinate; in particolare, negli anni 2000 sono stati messi in commercio in Europa due vaccini esavalenti, Hexavac (Sanofi Pasteur MSD) ed Infanrix Hexa (Glaxo Smith Kline), per la vaccinazione dei bambini. Entrambi i vaccini si sono rivelati sicuri; tuttavia, mentre il vaccino Infanrix Hexa ha dimostrato un'adeguata efficacia nei confronti di tutte le componenti antigeniche, il vaccino Hexavac si è rivelato poco immunogeno contro l'epatite B poiché a seguito di ciclo vaccinale primario la risposta anticorpale anti-HBV è risultata sub-ottimale rispetto a quella indotta dall'altro esavalente<sup>242,244,297-302</sup>. Di conseguenza, dal 2005 il vaccino Hexavac è stato sospeso e poi ritirato dal commercio<sup>303-305</sup>. Poiché al momento della sospensione erano già state distribuite circa 10 milioni di dosi, delle quali circa il 90% utilizzate per l'immunizzazione di bambini in Germania, Austria ed Italia, risulta tutt'oggi fondamentale un continuo follow up per monitorare la persistenza della memoria immunologica conferita da questo vaccino nei confronti di HBV.

### **Strategie vaccinali ed impatto globale della vaccinazione anti-HBV**

Con la messa in commercio dei primi vaccini anti-HBV, nei Paesi industrializzati sono iniziate le strategie per la prevenzione ed il controllo dell'infezione.

Le prime politiche vaccinali miravano all'immunizzazione dei soli gruppi di individui a maggior rischio di contrarre l'infezione per motivi professionali (operatori sanitari), per stili di vita (maschi omosessuali, persone con partner sessuali multipli, tossicodipendenti) oppure particolare categorie di pazienti, come dializzati ed emofilici, ma anche conviventi di portatori cronici e bambini nati da madre HBsAg positiva.

Questa strategia non si rivelò però molto efficace nel ridurre l'impatto dell'infezione da HBV nella popolazione poiché, fatta eccezione per il personale sanitario ed alcune categorie di pazienti particolarmente a rischio di esposizione al patogeno, spesso era difficile raggiungere i soggetti dei gruppi a rischio, che sovente risultavano già infetti prima della somministrazione del vaccino; inoltre per molte persone si rivelava complicata l'individuazione dei fattori di rischio, in quanto l'infezione da HBV è spesso asintomatica e si trasmette per via parenterale inapparente. Anche l'aumento dei viaggi dalle aree ad elevata endemia per HBV verso i Paesi a bassa endemia esponeva la popolazione ad un maggior rischio di contatto con il virus. In aggiunta, i governi di molti Paesi ostacolavano la diffusione dell'immunizzazione anti-HBV su larga scala non dando sufficiente importanza alle misure di prevenzione delle malattie infettive. Di conseguenza, questa prima strategia d'immunizzazione nei confronti di HBV si rivelò fallimentare in tutto il mondo, in quanto il tasso di copertura vaccinale nei gruppi a rischio rimase basso, senza condurre ad una riduzione dell'incidenza dell'infezione. Era dunque necessario introdurre una politica vaccinale in grado di garantire un'adeguata protezione fin dai primi anni di vita del soggetto quando maggiore è il rischio di sviluppare infezioni croniche<sup>306-308</sup>.

Alla luce di questa situazione, nei primi anni '90 il WHO ha raccomandato a livello mondiale l'inserimento dell'immunizzazione universale anti-epatite B per i bambini e/o per gli adolescenti nei programmi vaccinali nazionali. Le raccomandazioni del WHO, proposte nel 1991 ed approvate nel 1992, prevedevano il raggiungimento di tale obiettivo entro il 1995 per i Paesi ad elevata endemia (HBsAg  $\geq 8$ ) ed entro il 1997 in tutto il mondo<sup>309,310</sup>.

Mentre nel 1992 solo 31 Paesi avevano adottato una politica vaccinale anti-HBV per bambini e/o adolescenti, alla fine del 2015 sono 184 i Paesi in tutto il mondo che hanno seguito le raccomandazioni del WHO ed attualmente l'83% dei bambini riceve un ciclo vaccinale completo con 3 dosi di vaccino. Inoltre, 96 stati hanno introdotto la somministrazione della prima dose di vaccino anti-HBV alla nascita (entro le prime 24 ore di vita) raggiungendo una copertura globale del 39%<sup>2,311</sup>.

Per quanto riguarda la regione europea del WHO, 47 stati su 53 attuano l'immunizzazione universale contro HBV per bambini e/o adolescenti; in particolare 26 Paesi somministrano la prima dose di vaccino alla nascita, mentre gli altri 21 iniziano la vaccinazione anti-HBV intorno o oltre i 2 mesi di vita<sup>202</sup>. Nel 2008 la copertura vaccinale europea a seguito di 3 dosi di vaccino risultava pari al 76%, percentuale notevolmente in crescita rispetto al 2000 e 2003 quando era stata registrata una copertura pari rispettivamente al 40% e 67%. Tutt'oggi 6 stati (Regno Unito, Islanda, Svezia, Norvegia, Danimarca e Finlandia) hanno invece preferito mantenere la vaccinazione anti-epatite B per i soli gruppi a rischio, giustificando tale scelta con motivazioni di ordine economico.

La vaccinazione universale anti-HBV ha avuto un notevole impatto a livello mondiale e soprattutto nei Paesi ad alta endemia in cui il tasso di infezioni croniche è drasticamente sceso da valori superiori all'8-15% a livelli inferiori all'1% tra i vaccinati<sup>2</sup>.

Uno straordinario esempio del successo della vaccinazione universale anti-HBV proviene da Taiwan, una piccola area del continente asiatico ad elevata endemia per HBV in cui, a seguito dell'implementazione di strategie vaccinali soprattutto mirate alla popolazione infantile, è stato e viene tutt'oggi riscontrato un notevole decremento nell'incidenza dell'infezione da HBV e delle sue gravi sequele croniche. A Taiwan, fino ai primi anni '80 il 15-20% della popolazione totale (circa 3 milioni di persone) era portatore di HBsAg e oltre 9,000 persone morivano annualmente per epatocarcinoma, cirrosi epatica o altre malattie epatiche croniche di cui l'80% HBV-correlate. Il primo programma di immunizzazione anti-HBV è iniziato gratuitamente e su base volontaria nel 1984, coinvolgendo inizialmente solo i nati da madre portatrice di HBsAg. Nel 1986, la vaccinazione anti-HBV è stata estesa a tutti i nuovi nati e successivamente, nel periodo 1988-1991, ha coinvolto tutti i bambini in età scolastica e pre-scolastica ed infine gli adolescenti (1989-1991) e gli adulti (1991-1994)<sup>312</sup>. Dall'introduzione della vaccinazione universale anti-epatite B (1984) sono stati condotti studi di sierosorveglianza nella popolazione che hanno dimostrato una diminuzione delle infezioni da HBV, soprattutto tra i vaccinati. Nel 1984, la prevalenza di HBsAg in soggetti di età inferiore ai 15 anni risultava complessivamente pari a 9.8%, suddivisa in 5.1% nei primi 12 mesi di vita, 10.7% tra 1 e 2 anni e poi si manteneva costante intorno al 10% tra i 2 e 15 anni<sup>313</sup>. Già a 5 anni di distanza dall'implementazione della vaccinazione anti-HBV si è assistito ad un drastico calo della sieroprevalenza per HBsAg risultata circa 2% tra i soggetti <5 anni<sup>314</sup>. Dopo 10, 20 e 25 anni è stato possibile raggiungere complessivamente valori prossimi ed inferiori all'1% (rispettivamente 1.3%, 1.2% e 0.9%)<sup>315-317</sup>. Infine, a distanza di 30 anni, la sieroprevalenza per HBsAg e la sieropositività per anti-HBc si sono rivelate significativamente inferiori nel gruppo dei vaccinati rispetto a quello dei non

vaccinati (rispettivamente 0.5% e 4.5% vs. 6.7% e 44.7%)<sup>290</sup>. Anche l'incidenza del carcinoma epatocellulare ha subito rapidamente un notevole decremento: considerando la fascia d'età 6-9 anni è stata osservata una diminuzione dell'incidenza del tumore dallo 0.52 per 100,000 bambini nati prima dell'introduzione della vaccinazione universale (1974-1984) allo 0.13 per 100,000 in nati subito dopo l'inizio del programma di immunizzazione universale; mentre complessivamente nella fascia d'età 6-14 anni si è passati da 0.7 per 100,000 nel periodo 1981-86 allo 0.36 per 100,000 tra il 1990 ed il 1994<sup>318</sup>. Un ulteriore calo è stato osservato nel 2004, in cui nelle classi d'età 6-9 anni, 10-14 anni e 15-19 anni appartenenti alla coorte dei vaccinati l'incidenza del tumore epatico risultava rispettivamente dello 0.15, 0.19 e 0.16 per 100,000<sup>319</sup>. Infine, un recente studio mette in evidenza il maggior rischio di sviluppare epatocarcinoma tra i soggetti non vaccinati rispetto a quelli vaccinati (rispettivamente 0.293 vs. 0.117 per 100,000 persona-anno), evidenziando che l'incompleta immunizzazione è il principale fattore predittivo per lo sviluppo del tumore epatico<sup>320</sup>. Questi risultati indicano chiaramente come il vaccino anti-HBV sia stato il primo vaccino a prevenire uno dei più diffusi tumori a livello mondiale.

Altri esempi del successo della vaccinazione universale anti-HBV riguardano Paesi come Gambia, Malaysia, isola Hawaii ed Alaska.

In Gambia la vaccinazione anti-HBV per i bambini di età inferiore ai 5 anni è iniziata in due villaggi nel 1984 e si è successivamente estesa a tutta la nazione tra il 1986 ed il 1990. Già a distanza di circa 10 anni dall'inizio dell'immunizzazione universale il tasso di portatori cronici di HBsAg tra i vaccinati è risultato significativamente più basso rispetto a quello riscontrato tra i non vaccinati (rispettivamente 0.6-0.8% e 10-18.6%)<sup>288,321,322</sup>.

In Malaysia la vaccinazione anti-HBV è stata introdotta nei programmi di immunizzazione nazionali per l'infanzia nel 1989. A seguito di questa strategia preventiva, la prevalenza per HBsAg nella fascia d'età 7-12 anni è diminuita da 1.6% nel 1997 a 0.3% nel 2003, complessivamente con un tasso di 2.7% tra i non vaccinati e 0.4% tra i vaccinati<sup>323</sup>. Inoltre, più recentemente, è stato stimato che nel periodo 2005-2011 la sieroprevalenza per HBsAg tra studenti della facoltà di medicina ed odontoiatria dell'università di Malaya variava dall'1.08% tra i nati prima del 1989 allo 0.2% tra i nati dopo l'introduzione della vaccinazione universale anti-HBV (nati dopo il 1989)<sup>324</sup>.

Nelle isole Hawaii l'immunizzazione anti-HBV per i bambini è stata introdotta di routine tra le vaccinazioni per l'infanzia nel 1992 diventando un requisito obbligatorio per l'ingresso alla scuola primaria nel 1997. Dall'implementazione di questa strategia vaccinale è stato osservato un declino del 97% nelle infezioni croniche da HBV tra i bambini in età scolastica<sup>325</sup>.

Infine, in Alaska la vaccinazione universale anti-HBV per i bambini iniziò nel 1981-1982 nelle aree a maggiore endemia e fu estesa a livello nazionale nel 1984 riportando uno straordinario successo nel controllo dell'infezione: infatti, nella popolazione inferiore ai 20 anni, l'incidenza delle infezioni acute da HBV scese da 19 casi su 100,000 abitanti nel 1981-1982 a 0 casi nel 1993-1994, l'incidenza di epatocarcinoma diminuì da 3 a 0 casi per 100,000 abitanti rispettivamente negli anni 1984-1988 e 1995-1999, ma soprattutto il numero dei soggetti positivi per HBsAg passò da 657 nel 1987 a soli due soggetti nel 2008<sup>287</sup>.

Alla luce di questi esempi, oggi è possibile sostenere che l'introduzione della vaccinazione universale anti-HBV nei programmi di immunizzazione per l'infanzia nella maggior parte dei Paesi a

livello mondiale ha notevolmente cambiato il quadro epidemiologico dell'infezione riducendo non solo il tasso di incidenza di infezioni acute, ma soprattutto il rischio di infezioni croniche con le gravi sequele epatiche ad esse collegate.

Un problema emergente a seguito della diffusione su scala mondiale della vaccinazione anti-HBV è l'identificazione di mutanti virali potenzialmente in grado di eludere la risposta immunitaria sviluppata in seguito a vaccinazione. Ceppi mutanti virali indotti da vaccino sono stati identificati a livello mondiale e potrebbero interferire con l'efficacia dei programmi di vaccinazione universale anti-HBV<sup>128-133</sup>.

Sistemi di sorveglianza globale sono perciò necessari per mantenere sotto controllo l'impatto dei mutanti del gene S indotti da vaccino nell'epidemiologia dell'infezione da HBV ed eventualmente adottare adeguate strategie preventive.

### **La vaccinazione anti-HBV in Italia**

L'Italia è stato uno dei primi Paesi a livello mondiale ad aver inserito la vaccinazione anti-HBV nel piano vaccinale nazionale.

La vaccinazione contro l'epatite B è stata introdotta per la prima volta sul territorio italiano nel 1981 per l'immunizzazione dei pazienti e del personale dei reparti di emodialisi<sup>326</sup>. Nel 1983 è iniziato un programma selettivo di vaccinazione che aveva come target la popolazione a maggior rischio di esposizione al patogeno ed a seguito dei primi risultati incoraggianti, nel 1988 un decreto identificava chiaramente tali soggetti ad elevata possibilità di contrarre l'infezione (tossicodipendenti, omosessuali, persone con partner sessuali multipli, operatori sanitari, conviventi di portatori del virus, figli di madri positive al virus, emodializzati, politrasfusi) ai quali sarebbe stato offerto gratuitamente il vaccino<sup>327</sup>. Successivamente, nel 1991 è stata approvata una legge che autorizzava su scala nazionale la vaccinazione universale anti-HBV per i neonati e per i dodicenni (per quest'ultima categoria la legge era valida solo per i primi 12 anni dalla sua introduzione). Questo programma includeva anche lo screening per HBsAg delle donne gravide al terzo trimestre di gestazione, in modo da poter identificare precocemente le madri infette i cui figli necessitavano di un trattamento con immunoglobuline specifiche anti-HBV (HBIGs) e vaccino alla nascita; inoltre raccomandava la vaccinazione gratuita per tutti i soggetti considerati a rischio. Alla fine del 2003, cioè 12 anni dopo l'introduzione di tale programma di immunizzazione universale anti-HBV, la vaccinazione dei dodicenni è stata interrotta (poiché tutti i bambini in questa età erano già stati vaccinati), mentre è stata mantenuta la vaccinazione per i nuovi nati<sup>328-329</sup>.

Oggi, in Italia, per la vaccinazione contro l'epatite B è raccomandata la somministrazione di 3 dosi di vaccino anti-HBV (monovalente o combinato) per completare un ciclo di immunizzazione primaria.

Il ciclo vaccinale primario nei neonati è caratterizzato da dosaggio pediatrico (5-10 µg di HBsAg per dose di vaccino), ma la scheda vaccinale è diversificata a seconda che i bambini siano nati da madre HBsAg negativa o positiva. Nel primo caso, la vaccinazione anti-HBV va somministrata al 3°, 5° e 11° mese di vita, contemporaneamente alle altre vaccinazioni obbligatorie e raccomandate per l'infanzia.

Nel secondo caso, invece, la vaccinazione anti-HBV inizia alla nascita con una dose di vaccino monovalente somministrato insieme ad immunoglobuline specifiche entro le prime 24 ore di vita; tale dose deve poi essere seguita da altre 2 somministrazioni di vaccino anti-HBV (monovalente o combinato) per completare il ciclo vaccinale primario, da somministrare rispettivamente a distanza di 4 settimane dalla prima dose e subito dopo il compimento del secondo mese di vita. In alcuni casi viene somministrata una quarta dose all'undicesimo mese di vita insieme alle altre vaccinazioni dell'infanzia.

Per quanto riguarda invece gli adolescenti e gli adulti sfuggiti all'immunizzazione dell'infanzia e/o a rischio di contrarre l'infezione, la vaccinazione anti-HBV prevede la somministrazione di 3 dosi di vaccino monovalente ai tempi 0, 1 e 6 mesi con dosaggio adulto (10-20 µg di HBsAg per dose di vaccino).

A seguito di un ciclo vaccinale primario (sia nei neonati, sia negli adolescenti, sia negli adulti) non è necessaria la somministrazione di dosi di richiamo.

In generale, nel nostro Paese l'esecuzione di test per valutare il titolo anticorpale post-vaccinazione non è prevista per legge; tuttavia fanno eccezione il personale sanitario ed i soggetti emodializzati e/o immunocompromessi. In entrambi i casi è opportuna la valutazione della risposta anticorpale a distanza di 1-2 mesi dall'ultima dose di vaccino, mentre per le persone vaccinate in passato tale valutazione risulta obbligatoria per l'idoneità lavorativa al momento dell'inizio dell'attività come operatore sanitario. Qualunque sia il tempo trascorso dall'ultima dose di vaccino, in caso di test anti-HBs con concentrazione  $\geq 10$  UI/l (test positivo) non sono necessarie ulteriori dosi di richiamo, invece, in caso di anti-HBs  $< 10$  UI/l (test negativo) è indicata la somministrazione di un'ulteriore dose di vaccino seguita da valutazione della risposta anticorpale a distanze di 1-2 mesi. In caso di persistenza di negatività al test non sono indicate ulteriori somministrazioni, ma il soggetto deve essere considerato suscettibile all'infezione da HBV ed informato circa le possibilità di profilassi post-esposizione (somministrazione di immunoglobuline specifiche anti-HBV) in caso di esposizione accidentale al patogeno<sup>330</sup>.

La strategia vaccinale italiana è stata un successo fin dal principio; in pochi anni infatti è stata raggiunta una copertura vaccinale del 95%. Ad oggi, sono circa 20 milioni le persone (soprattutto bambini e giovani adulti al di sotto dei 35 anni di età) che sono state vaccinate contro il virus dell'epatite B con straordinari risultati in termini di sicurezza ed efficacia. I dati epidemiologici del SEIEVA prima e dopo l'introduzione della vaccinazione mostrano chiaramente che il tasso di infezione da HBV è notevolmente diminuito (l'incidenza della malattia è scesa da 5.1 casi per 100,000 abitanti nel 1991 a 0.6 casi nel 2015) ed anche la prevalenza dei marcatori di infezione (HBsAg e/o anti-HBc) si è drasticamente ridotta<sup>204,331-335</sup>. In aggiunta, la diminuzione dei casi di epatite B ha permesso una riduzione dei casi di epatite delta, infezione a carico del fegato che dipende strettamente dalla presenza del virus dell'epatite B<sup>336</sup>.

Complessivamente, il programma di vaccinazione anti-HBV in Italia si è rivelato estremamente efficace sia dal punto di vista clinico nel prevenire e controllare l'infezione da HBV sia in termini economici<sup>331-337</sup>; tuttavia è necessario un continuo monitoraggio dell'epidemiologia dell'infezione, soprattutto a fronte della limitata ma continua individuazione di casi di epatite B acuta in soggetti vaccinati.

# *SCOPO della TESI*

## SCOPO DELLA TESI

L'epatite virale di tipo B, pur rimanendo a livello mondiale un importante problema di sanità pubblica, è una malattia prevenibile mediante vaccinazione. La vaccinazione anti-epatite B si è dimostrata essere la misura più efficace per il controllo e la prevenzione dell'infezione e delle sue sequele croniche più gravi, quali cirrosi e carcinoma epatocellulare.

Nonostante il grande successo su scala mondiale della vaccinazione anti-epatite B nella riduzione dell'incidenza, dello stato di portatore e della morbosità e della mortalità HBV-correlata, per la sanità pubblica risulta fondamentale il continuo monitoraggio delle strategie vaccinali al fine di identificare eventuali misure correttive e di mantenere sotto controllo l'epidemiologia dell'infezione. A questo scopo è stato condotto il presente lavoro di tesi di dottorato, che offre una panoramica sull'impatto della vaccinazione contro l'epatite B in Italia, articolandosi in tre linee di studio differenti e prefissandosi nello specifico i seguenti obiettivi:

- valutazione dell'immunogenicità a lungo termine contro il virus dell'epatite B conferita dai vaccini monovalenti (*Studio 1*) e dai vaccini esavalenti (*Studio 2*) in Italia;
- valutazione epidemiologica delle epatiti acute da HBV in Italia dopo l'introduzione della vaccinazione universale anti-epatite B (*Studio 3*).



# *STUDIO 1:*

*Valutazione dell'immunogenicità a lungo termine contro il virus dell'epatite B conferita dai vaccini monovalenti sul territorio italiano*

# **STUDIO 1: Valutazione dell'immunogenicità a lungo termine contro il virus dell'epatite B conferita dai vaccini monovalenti sul territorio italiano**

## **PREMESSA**

Nel 1991 è stata introdotta in Italia la vaccinazione universale anti-epatite B per tutti i nuovi nati e, fino al 2003, anche per i dodicenni<sup>328,329</sup>.

A seguito di un ciclo vaccinale primario completo (3 dosi di vaccino anti-epatite B), circa il 99% dei soggetti immunizzati mostra una sierconversione anticorpale (concentrazione di anticorpi anti-HBs >0.0 UI/l), ed oltre il 95% dei soggetti risulta sieroprotetto (concentrazione di anti-HBs  $\geq 10$  UI/l)<sup>261,338-340</sup>.

L'immunogenicità del vaccino anti-epatite B non è tuttavia legata alla sola produzione di anticorpi anti-HBs, ma più importante risulta l'attivazione dei linfociti B e T che conferiscono la cosiddetta memoria immunologica<sup>283-286</sup>.

Diversi studi hanno dimostrato che la concentrazione di anticorpi anti-HBs circolanti diminuisce ed addirittura può scendere al di sotto dei livelli protettivi (<10 UI/l) in circa il 15-50% dei vaccinati a distanza di 5-15 anni dall'immunizzazione primaria<sup>322,341-343</sup>. Tuttavia, in seguito a stimolazione antigenica mediante la somministrazione di una dose booster di vaccino anti-epatite B, la memoria immunologica conferita dal ciclo vaccinale primario si riattiva come mostrato da una rapida risposta anamnesticca (rialzo del titolo anticorpale) tale da garantire protezione nei confronti di un'eventuale esposizione al virus fino a 20-25 anni di distanza<sup>227,317,344-346</sup>.

Nonostante la memoria immunologica persista più a lungo degli anticorpi circolanti, l'effettiva durata dell'immunità umorale e cellulare conferita dai vaccini monovalenti anti-epatite B è una questione ancora dibattuta. Inoltre, recenti studi soprattutto condotti in aree ad elevata endemia per HBV, come i Paesi asiatici, hanno evidenziato che la memoria immunologica sembra svanire dopo circa vent'anni dall'immunizzazione primaria ponendo in evidenza la questione della necessità o meno di somministrare dosi booster in grado di garantire una protezione a lungo termine<sup>291-296</sup>.

A questo proposito risulta fondamentale monitorare nel tempo la persistenza di protezione nei confronti dell'infezione da virus dell'epatite B conferita dai vaccini monovalenti soprattutto per quegli individui vaccinati in età infantile e che ora si trovano in quelle fasce di età in cui è maggiore il rischio di esposizione all'infezione da HBV.

## **OBIETTIVO DELLO STUDIO**

Obiettivo dello studio è stato quello di valutare la persistenza degli anticorpi anti-HBs e della memoria immunologica nei confronti del virus dell'epatite B a distanza di 18-19 anni dopo il completamento di un ciclo vaccinale primario, in due coorte di individui italiani sani immunizzati rispettivamente da bambini (entro il primo anno di vita) e da adolescenti (dodicesimo anno di età).

## **DISEGNO DELLO STUDIO**

È stato condotto uno studio retrospettivo e multicentrico per valutare la persistenza dell'immunità umorale e cellulare conferita dai vaccini monovalenti anti-epatite B a distanza di 18-19 anni dall'immunizzazione primaria.

Nel corso dello studio sono stati considerati sieroprotetti contro il virus dell'epatite B i soggetti con concentrazione di anticorpi anti-HBs  $\geq 10$  UI/l.

All'*arruolamento*, per poter partecipare allo studio, dovevano essere soddisfatti i seguenti criteri di inclusione:

- soggetti sani di entrambi i sessi;
- ragazzi o giovani adulti, nati da madre HBsAg negativa, vaccinati contro HBV rispettivamente nel primo anno di vita o da adolescenti (nel dodicesimo anno di età);
- immunizzazione primaria anti-epatite B completata (tre dosi di vaccino) circa 18-19 anni prima rispetto alla data dell'arruolamento;
- ciclo vaccinale primario completo con 3 dosi di vaccino ricombinante monovalente anti-epatite B (Engerix B o Recombivax HB): in particolare, 3 dosi pediatriche somministrate a 3, 5 e 11 mesi di vita per i soggetti vaccinati da bambini, 3 dosi adulte somministrate ai tempi 0, 1 e 6 mesi per i soggetti vaccinati da adolescenti;
- consenso informato scritto firmato per la partecipazione volontaria allo studio.

Non potevano, invece, partecipare allo studio i soggetti che presentavano uno o più dei seguenti criteri di esclusione:

- scheda vaccinale incompleta;

- ciclo vaccinale primario con più di 3 dosi di vaccino monovalente anti-epatite B o somministrazione di dosi aggiuntive di vaccino anti-HBV nel periodo intercorso tra ciclo primario e data di arruolamento;
- diagnosi clinica pregressa di epatite B;
- presenza di patologie croniche o deficit del sistema immunitario;
- ipersensibilità o allergie accertate ai componenti del vaccino ricombinante anti-epatite B.

I soggetti arruolati sono stati suddivisi in due coorti in base all'età in cui hanno ricevuto l'immunizzazione primaria con vaccino monovalente anti-epatite B: coorte A costituita da ragazzi vaccinati da bambini e coorte B formata da giovani adulti vaccinati da adolescenti.

I ragazzi vaccinati da bambini sono stati arruolati in 10 ASL dislocate sul territorio nazionale, mentre i giovani adulti vaccinati da adolescenti sono stati arruolati tra i donatori di sangue afferenti al Dipartimento di Medicina Trasfusionale ed Immunoematologia di Sondrio.

Per tutti gli arruolati è stata verificata la sussistenza dei criteri di inclusione/esclusione allo studio. Sono stati consultati i certificati di vaccinazione o i registri vaccinali delle ASL per verificare i dati relativi la storia vaccinale; inoltre, per ogni individuo sono stati raccolti i dati relativi ad età, genere e luogo di provenienza.

In seguito all'arruolamento, a ciascun soggetto è stato prelevato un campione di sangue (*visita 1*) per l'esecuzione dei test sierologici presso il Laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute dell'Università degli Studi di Milano, in quanto laboratorio di riferimento per l'esecuzione dei test virologici. In particolare, il primo prelievo è stato saggiato per:

- determinare la concentrazione di anticorpi anti-HBs a distanza di 18-19 anni dal completamento del ciclo vaccinale primario anti-epatite B (anti-HBs test 1 – pre-booster)
- valutare l'eventuale presenza di anticorpi anti-HBc, come marcatore virologico di infezione.

I campioni di siero risultati positivi per anti-HBc sono stati ulteriormente testati per indagare la presenza di ulteriori marcatori virali quali HBsAg e HBV-DNA. I soggetti risultati positivi per uno o più marcatori di infezione virale (anti-HBc, HBsAg, HBV-DNA) sono stati esclusi dalle successive fasi dello studio per non conformità con i criteri di inclusione (sospetta infezione da HBV insorta precedentemente allo studio, seppur non diagnosticata). In questo studio è stata definita come infezione benigna da HBV la presenza di anti-HBc in assenza di HBsAg e HBV-DNA.

In accordo con quanto stabilito dal protocollo dello studio, i soggetti inclusi nello studio con concentrazione di anti-HBs  $\geq 10$  UI/l sono stati considerati protetti nei confronti del virus dell'epatite B, mentre ai soggetti con livelli di anti-HBs  $< 10$  UI/l è stata offerta una dose booster di vaccino monovalente anti-epatite B, somministrata presso la rispettiva ASL di arruolamento (*visita 2*). Dopo circa 2 settimane dalla dose booster, è stato effettuato un secondo prelievo di sangue (*visita 3*) ed è stata nuovamente determinata la concentrazione di anticorpi anti-HBs post-booster per valutare la risposta anamnesticca (anti-HBs test 2 – post-booster). Un aumento della concentrazione di anti-HBs post-booster ad almeno 10 UI/l (livello protettivo) è stata considerata come risposta anamnesticca positiva. Ai soggetti con titolo anticorpale post-booster non protettivo è stato offerto il completamento di un secondo ciclo vaccinale anti-epatite B, ovvero la somministrazione di 2 dosi di vaccino anti-epatite B ricombinante monovalente rispettivamente a distanza di 1 e 6 mesi dalla somministrazione del booster (*visita 4*). Dopo circa 1-3 mesi dalla terza dose è stato eseguito un ulteriore prelievo di sangue e nuovamente determinata la concentrazione di anti-HBs (*visita 5*).

In questo studio non è stato effettuato alcun confronto tra i vaccini impiegati per l'immunizzazione primaria (Engerix B o Recombivax HB) in quanto considerati simili in termini di sicurezza ed immunogenicità ed entrambi raccomandati dal Ministero della Salute italiano.

Il protocollo dello studio è stato approvato dal comitato etico e lo studio è stato condotto secondo la Dichiarazione di Helsinki.

Lo schema del disegno dello studio è riportato in Figura 33.

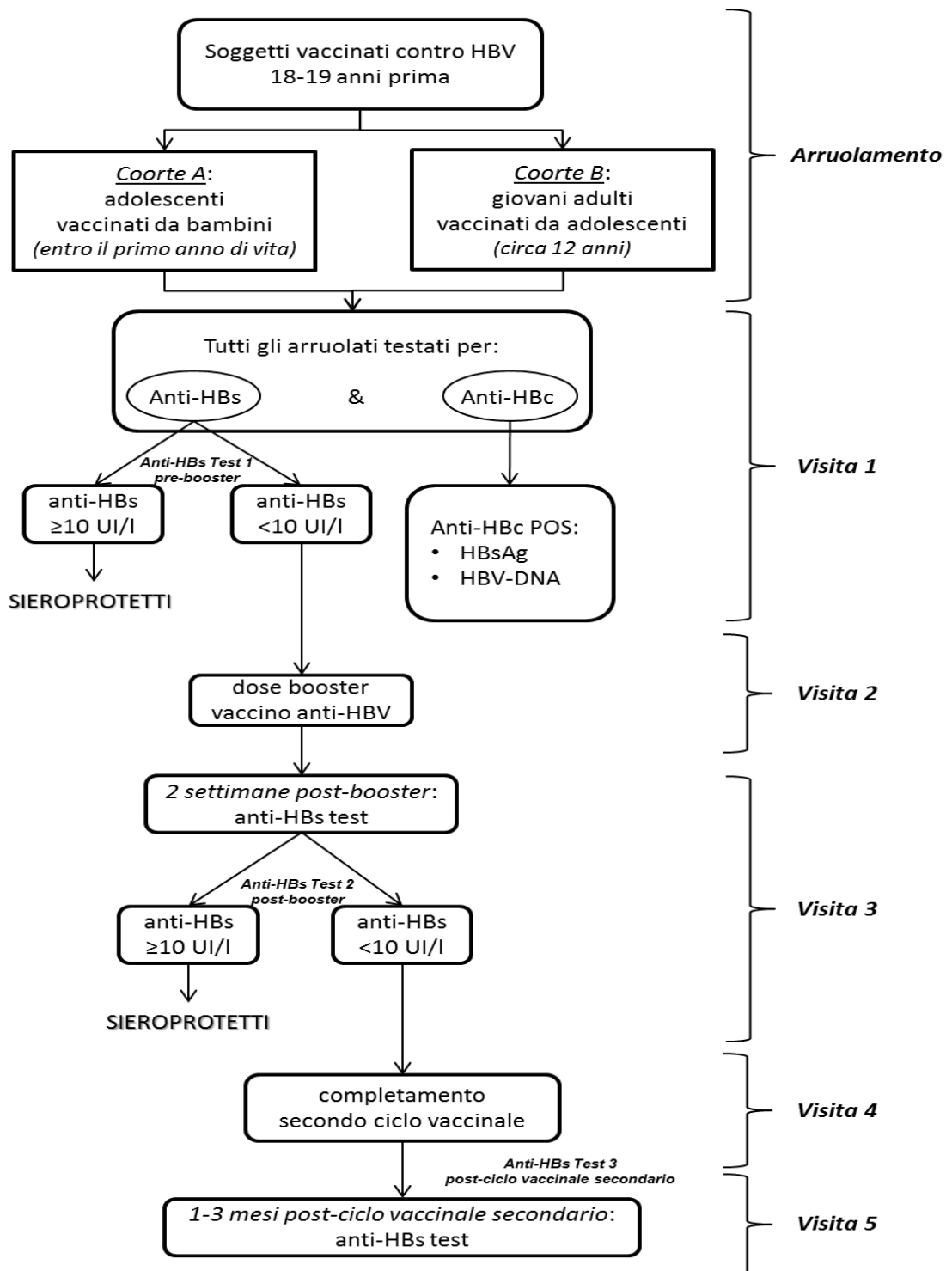


Figura 33: Disegno dello studio.

## **MATERIALI E METODI**

### **Prelievi di sangue**

I prelievi di sangue (visita 1, 3, 5) sono stati effettuati da personale qualificato presso la ASL di arruolamento dei singoli individui.

A seguito di opportuna centrifugazione, il campione di siero è stato separato dalla componente ematica corpuscolare entro 4 ore dal prelievo e conservato congelato fino all'invio al laboratorio di riferimento per l'esecuzione dei test sierologici e molecolari per i marcatori di HBV.

### **Test sierologici e molecolari**

Tutti i test sierologici e molecolari sono stati effettuati presso il Laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute dell'Università degli Studi di Milano.

### **Test sierologici**

I test sierologici sono stati eseguiti con l'impiego dell'analizzatore automatico ABBOTT AxSYM System (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) mediante metodo immunoenzimatico a cattura di micro-particelle (MEIA).

Il dosaggio MEIA utilizza una soluzione di particelle di lattice di dimensioni inferiori al micron in sospensione, rivestite da molecole di cattura specifiche per l'analita in esame (antigene, anticorpo o particella virale).

Nell'area del campione dello strumento, i reattivi ed il campione da sottoporre ad uno specifico dosaggio sono trasferiti in una cartuccia di reazione e poi nell'area di processo dell'analizzatore per essere incubati alla temperatura di reazione al fine di formare l'immunocomplesso (antigene-anticorpo). La miscela di reazione viene quindi trasferita su una matrice inerte di fibre di vetro in grado di trattenere irreversibilmente il complesso immune, permettendo invece il deflusso della miscela di reazione attraverso gli ampi pori della matrice. La rilevazione dei complessi immuni viene effettuata utilizzando un coniugato marcato con fosfatasi alcalina che catalizza l'idrolisi del substrato 4-metil-umbelliferilfosfato (MUP) a 4-metil-umbelliferone (MU). La velocità con cui tale prodotto viene generato a livello della matrice è proporzionale alla concentrazione dell'analita presente nel campione in esame. La tecnologia ed il funzionamento del sistema permettono di completare i dosaggi entro circa 30 minuti.

Nel corso dello studio sono stati eseguiti con dosaggio MEIA i seguenti test sierologici:

- determinazione quantitativa degli anticorpi anti-HBs in fase pre-booster (visita 1 – anti-HBs test 1), post-booster (visita 3 – anti-HBs test 2) e post-ciclo vaccinale secondario (visita 5 – anti-HBs test 3);
- determinazione qualitativa (visita 1) degli anticorpi anti-HBc;
- determinazione qualitativa di HBsAg (visita 1, in caso di positività per anti-HBc).

### **Immunodosaggio anti-HBs**

La determinazione quantitativa degli anticorpi anti-HBs è stata eseguita su campioni di siero mediante kit commerciale AxSYM AUSAB (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) seguendo la procedura operativa riportata dal produttore.

In breve, le reazioni del dosaggio AxSYM AUSAB si svolgono nel seguente ordine:

- il campione e le micro-particelle, rivestite di antigeni di superficie del virus dell'epatite B ricombinante (rHBsAg), vengono dispensati in un pozzetto della cartuccia di reazione affinché gli anticorpi anti-HBs eventualmente presenti nel campione si leghino all'antigene formando un complesso antigene-anticorpo nella miscela di reazione;
- un'aliquota della miscela di reazione viene trasferita nella celletta a matrice per permettere agli immunocomplessi di legarsi in maniera irreversibile alla matrice di fibre di vetro;
- l'antigene di superficie del virus dell'epatite B ricombinante (rHBsAg) marcato con biotina viene dispensato nella celletta a matrice formando un complesso antigene-anticorpo-antigene;
- gli anticorpi anti-biotina coniugati con fosfatasi alcalina vengono dispensati nella celletta a matrice e si legano ad ogni complesso antigene-anticorpo-antigene, mentre una successiva fase di lavaggio permette la rimozione del materiale non legato;
- l'aggiunta di substrato MUP in presenza di coniugato favorisce la reazione chimica  $MUP \rightarrow MU$  con emissione di fluorescenza misurata mediante sistema ottico MEIA (Figura 34).



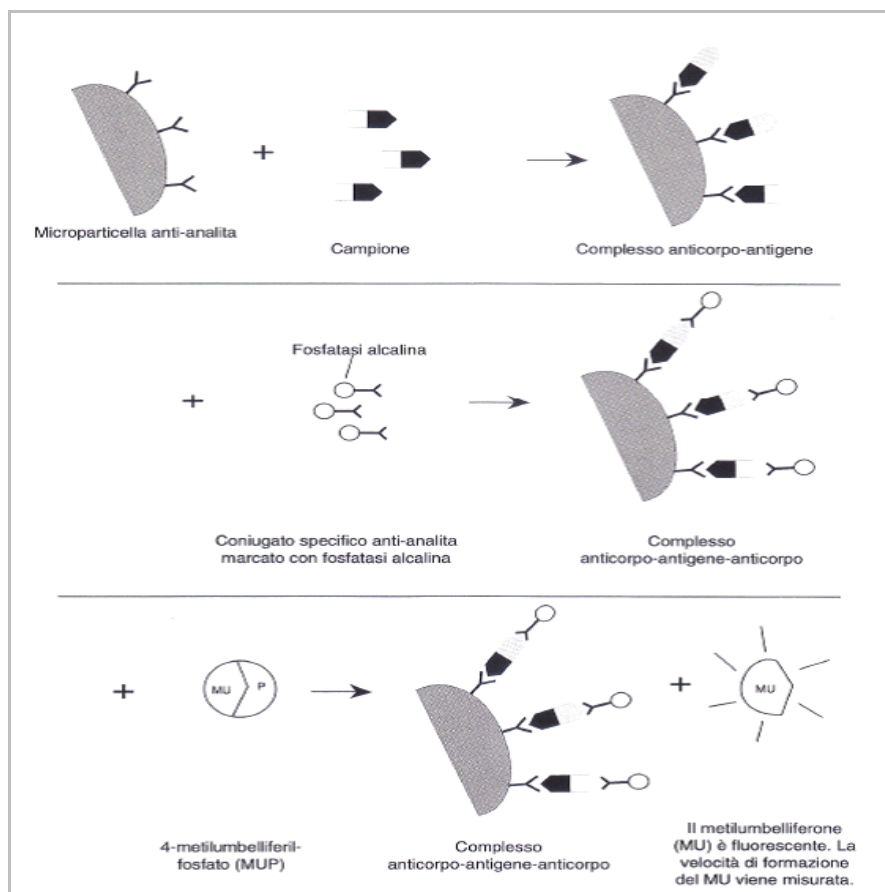


Figura 34: Rappresentazione schematica della reazione MEIA per la rilevazione di anti-HBs.

La concentrazione di anticorpi anti-HBs nel campione viene determinata in base ad una curva di calibrazione precedentemente costruita con l'uso di 6 calibratori a concentrazione nota (0, 10, 50, 100, 500, 1000 UI/l).

Il range di misurazione del dosaggio AxSYM AUSAB è 2.0-1000.0 UI/l, definito come il range compreso tra il limite di rilevazione ed il massimo della curva di calibrazione.

Se la concentrazione di anti-HBs del campione risulta pari o superiore a 10.0 UI/l il campione viene considerato reattivo per gli anticorpi anti-HBs, mentre con valori di anti-HBs <10 UI/l il campione viene considerato non reattivo. Per concentrazioni >1000.0 UI/l, il campione deve essere manualmente diluito con apposita matrice di diluizione (dilution reagent AxSYM AUSAB) e ri-testato per ottenere la concentrazione finale.

Ogni seduta analitica viene validata mediante l'impiego di 2 controlli, uno negativo (concentrazione media anti-HBs 0.0 UI/l – range di accettabilità 0.0-2.0 UI/l) ed uno positivo (concentrazione media anti-HBs 80 UI/l – range di accettabilità 60.0-100.0 UI/l), da testare in singolo almeno una volta ogni 24 ore (Figura 35).

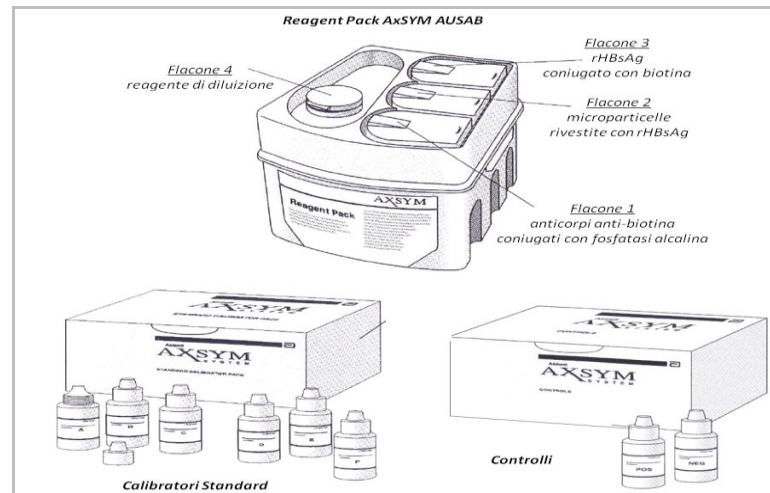


Figura 35: Dosaggio immunoenzimatico AxSYM AUSAB.

### Immunodosaggio anti-HBc

La determinazione qualitativa degli anticorpi anti-HBc è stata eseguita mediante kit commerciale AxSYM CORE (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) seguendo la procedura operativa riportata dal produttore.

Le reazioni del dosaggio AxSYM CORE sono di seguito riassunte:

- il campione, il diluente del campione e le micro-particelle, rivestite di antigene ricombinante del core del virus dell'epatite B (rHBcAg), vengono dispensati in un pozzetto della cartuccia di reazione affinché gli anticorpi anti-HBc eventualmente presenti nel campione si leghino all'antigene formando un complesso antigene-anticorpo nella miscela di reazione;
- un'aliquota della miscela di reazione viene trasferita nella celletta a matrice per permettere agli immunocomplessi di legarsi in maniera irreversibile alla matrice di fibre di vetro;
- gli anticorpi contro l'antigene del core del virus dell'epatite B coniugati con fosfatasi alcalina vengono dispensati nella celletta a matrice e si legano ai siti antigenici di rHBcAg sulle microparticelle non legati dagli anticorpi anti-HBc presenti nel campione;
- la celletta a matrice viene lavata per rimuovere il materiale non legato alle microparticelle;
- l'aggiunta di substrato MUP in presenza di coniugato favorisce la reazione chimica  $MUP \rightarrow MU$  con emissione di fluorescenza misurata mediante sistema ottico MEIA (Figura 36).

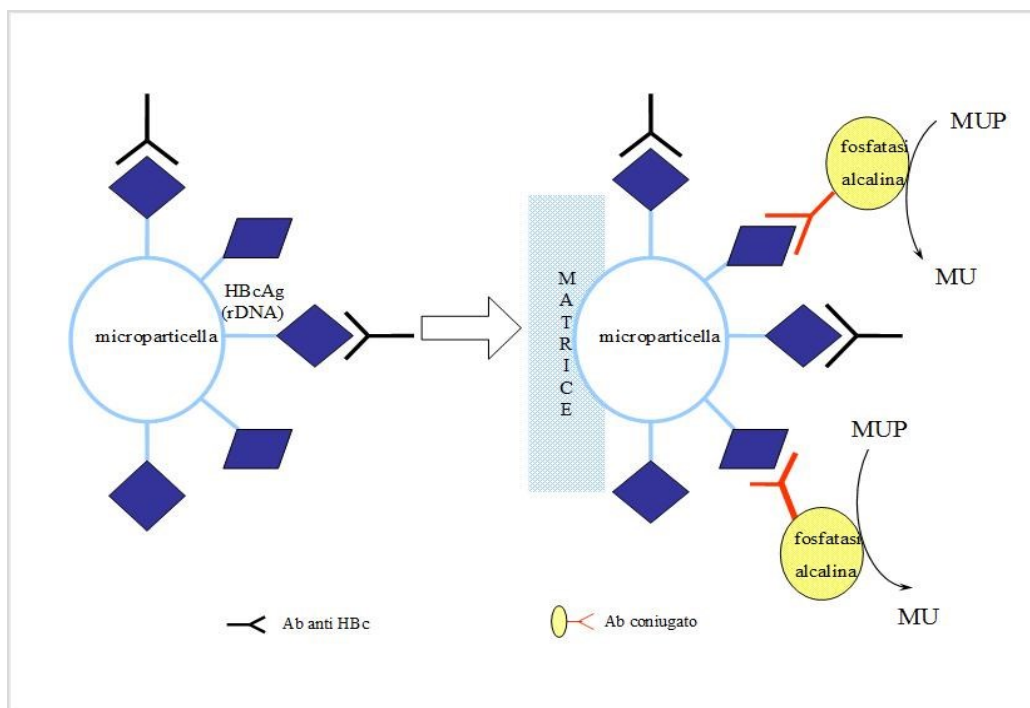


Figura 36: Rappresentazione schematica della reazione MEIA per la rilevazione di anti-HBc.

La presenza o l'assenza di anticorpi anti-HBc nel campione viene determinata confrontando la velocità di formazione del prodotto fluorescente con un valore limite (cut off) calcolato in base ad una precedente calibrazione indice utilizzando un apposito calibratore AxSYM CORE testato in duplicato. Se la velocità di formazione del prodotto fluorescente nel campione in esame è pari o inferiore al valore limite del calibratore, il campione viene considerato reattivo per gli anticorpi anti-HBc. Il valore limite corrisponde alla metà del valore medio del calibratore indice. Il valore del campione viene quindi confrontato con il valore limite del calibratore in modo da ottenere un rapporto S/CO (valore del campione/valore limite del calibratore).

L'interpretazione dei risultati con dosaggio AxSYM CORE prevede che campioni con valori di S/CO compresi nel range 0.000-1.000 siano considerati reattivi, mentre campioni con valori compresi tra 1.001 e 3.000 S/CO vengano considerati negativi per anti-HBc. Tutti i campioni reattivi al dosaggio iniziale devono essere rianalizzati in duplicato e vengono considerati positivi per anti-HBc se almeno una delle due ripetizioni risulta reattiva (campioni reattivi in modo riproducibile).

La sensibilità del dosaggio AxSYM CORE corrisponde ad una concentrazione di anticorpi anti-HBc inferiore ad 1 unità PEI/ml.

Ogni seduta analitica viene validata mediante l'impiego di 2 controlli, uno negativo (concentrazione anti-HBc 0 unità PEI/ml – range di accettabilità 1.700-2.500 S/CO) ed uno positivo (concentrazione anti-HBc 0.5-2.0 unità PEI/ml – range di accettabilità 0.050-0.800 S/CO), da testare in singolo almeno una volta ogni 24 ore (Figura 37).

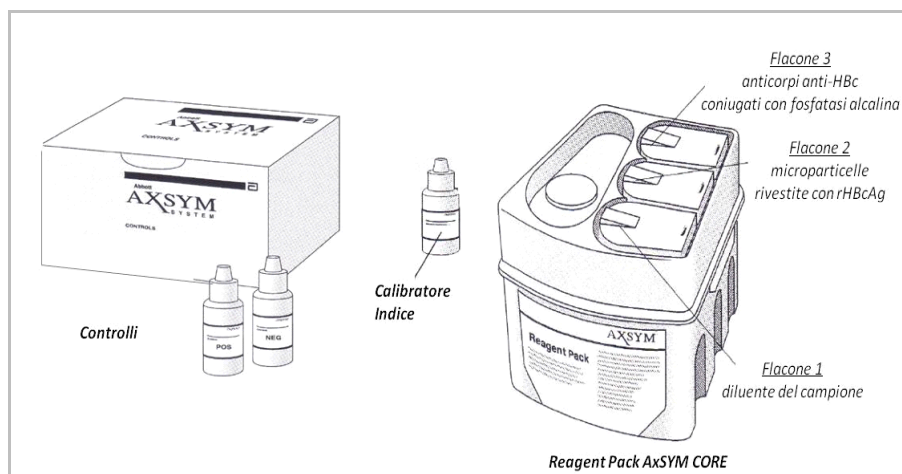


Figura 37: Dosaggio immunoenzimatico AxSYM CORE.

### Immunodosaggio HBsAg

La determinazione qualitativa di HBsAg è stata eseguita mediante kit commerciale AxSYM HBsAg V2 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) seguendo la procedura operativa riportata dal produttore.

In breve, le reazioni del dosaggio AxSYM HBsAg V2 sono di seguito riportate:

- il campione, le micro-particelle rivestite di anticorpi anti-HBs e gli anticorpi anti-HBs marcati con biotina vengono dispensati in un pozzetto della cartuccia di reazione affinché l'antigene HBs eventualmente presente nel campione si possa legare agli anticorpi formando un complesso anticorpo-antigene-anticorpo nella miscela di reazione;
- un'aliquota della miscela di reazione viene trasferita nella celletta a matrice per permettere agli immunocomplessi di legarsi in maniera irreversibile alla matrice di fibre di vetro;
- gli anticorpi anti-biotina coniugati con fosfatasi alcalina vengono dispensati nella celletta a matrice e si legano agli immunocomplessi anticorpo-antigene-anticorpo;
- la celletta a matrice viene lavata per rimuovere il materiale non legato alle micro-particelle;
- l'aggiunta di substrato MUP in presenza di coniugato favorisce la reazione chimica  $MUP \rightarrow MU$  con emissione di fluorescenza misurata mediante sistema ottico MEIA (Figura 38).

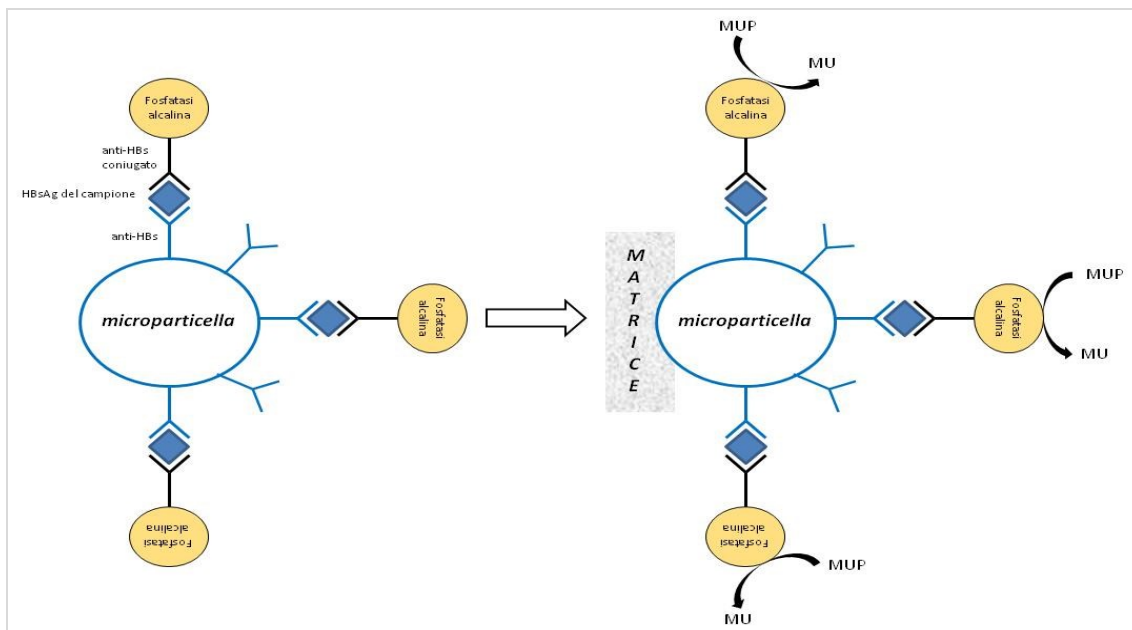


Figura 38: Rappresentazione schematica della reazione MEIA per la rilevazione di HBsAg.

La presenza o l'assenza di HBsAg nel campione viene determinata confrontando la velocità di formazione del prodotto fluorescente con un valore limite calcolato in base ad una precedente calibrazione indice con apposito calibratore AxSYM HBsAg V2, testato in cinque replicati. Se la velocità di formazione del prodotto fluorescente nel campione in esame è pari o superiore al valore limite del calibratore, il campione viene considerato reattivo per l'antigene HBs. Il valore limite corrisponde al valore medio dei cinque replicati del calibratore indice. Il risultato del dosaggio viene espresso come rapporto S/N (valore del campione/valore medio del calibratore indice).

L'interpretazione dei risultati con dosaggio AxSYM HBsAg V2 prevede che campioni con valori di S/N pari o superiori a 2.000 siano considerati reattivi, mentre campioni con valori inferiori a 2.000 S/N vengano considerati negativi per HBsAg. Tutti i campioni reattivi al dosaggio iniziale devono essere ri-analizzati in duplicato e vengono considerati reattivi per HBsAg in modo riproducibile se almeno una delle due ripetizioni risulta reattiva. Un campione reattivo in modo riproducibile deve essere analizzato con test di neutralizzazione per confermare la positività per HBsAg.

La sensibilità del dosaggio AxSYM HBsAg V2 è dichiarata pari a 0.031 unità PEI/ml.

Ogni seduta analitica viene validata mediante l'impiego di 2 controlli, uno negativo (concentrazione HBsAg 0 ng/ml – range di accettabilità 0.70-1.30 S/N) ed uno positivo (concentrazione HBsAg 4-15 ng/ml – range di accettabilità 7.00-63.00 S/N), da testare in singolo almeno una volta ogni 24 ore (Figura 39).

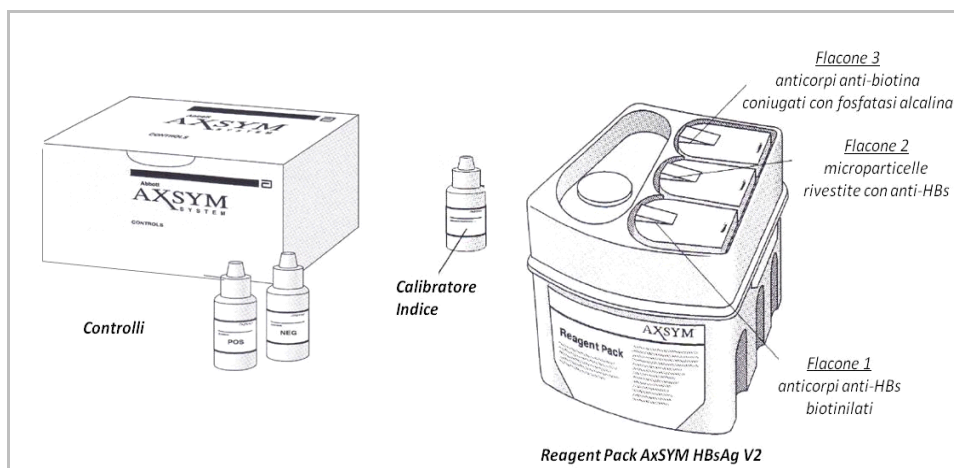


Figura 39: Dosaggio immunoenzimatico AxSYM HBsAg V2.

## Test molecolari

I test molecolari sono stati impiegati per la rilevazione di HBV-DNA, marcatore la cui presenza è indice di infezione acuta o cronica e di replicazione virale.

L'eccezionale sensibilità della metodica di PCR (polymarase chain reaction) permette una rapida individuazione dei patogeni mediante l'identificazione del loro genoma virale, soprattutto per quei virus di cui risulta difficoltosa la coltura cellulare.

Per questo studio, il genoma virale di HBV è stato amplificato e quantificato mediante real time PCR con l'impiego dell'analizzatore COBAS TaqMan 48 (Roche, Branchburg, NJ, USA)

## Real Time PCR per HBV-DNA

La determinazione qualitativa e quantitativa di HBV-DNA è stata condotta a partire da campioni di siero con l'utilizzo del kit commerciale COBAS TaqMan HBV Test for use with the High Pure System (Roche, Branchburg, NJ, USA) (Figura 40) seguendo la procedura operativa riportata dal produttore.

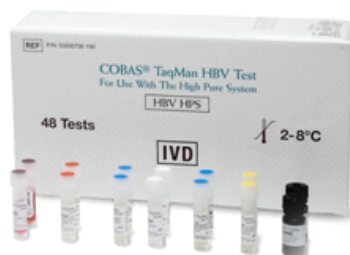


Figura 40: Kit commerciale COBAS TaqMan HBV test for use with the High Pure System (Roche).

Il test COBAS TaqMan HBV prevede due fasi principali:

- preparazione manuale del campione per ottenere DNA di HBV (*fase di estrazione*);
- amplificazione automatica mediante PCR del DNA target usando primers complementari specifici per HBV e sonde di rilevazione oligonucleotidiche marcate con traccianti fluorescenti che permettono la quantificazione del prodotto amplificato dell'HBV target (amplicone) e del DNA dello standard di quantificazione dell'HBV che viene trattato, amplificato e rilevato simultaneamente con il campione (*fase di amplificazione e quantificazione*).

### Fase di estrazione

Nella fase di estrazione il DNA dell'HBV viene isolato attraverso una preparazione manuale del campione basata sul legame dell'acido nucleico a fibre di vetro.

Le cellule e le particelle virali di HBV eventualmente presenti nel campione vengono lisate mediante incubazione ad una temperatura elevata (50°C per 10 minuti) in presenza di una proteasi ed un tampone caotropico lisante/legante che libera gli acidi nucleici e li protegge dalle nucleasi presenti nel campione biologico. Dopo l'aggiunta di isopropanolo, la miscela di lisi viene centrifugata attraverso una colonna con un inserto filtrante in fibra di vetro cosicché gli acidi nucleici si legano alla superficie del filtro (adsorbimento) mentre le sostanze non legate (sali, proteine e altre impurità cellulari) vengono rimosse. Gli acidi nucleici adsorbiti vengono quindi lavati e successivamente eluiti con una soluzione acquosa.

Nella fase di estrazione, vengono aggiunti 2 controlli positivi (DNA plasmidico linearizzato a doppio filamento contenente sequenze di HBV rispettivamente ad alta e bassa concentrazione) ed 1 controllo negativo (plasma umano negativo per HBV-DNA) da trattare in parallelo ai campioni e da includere nella successiva fase di amplificazione per validare l'intero processo analitico.

All'inizio del processo di estrazione, in ciascun campione e controllo viene incorporato un numero noto di molecole di DNA di uno standard di quantificazione dell'HBV. Si tratta di un plasmide linearizzato non infettivo contenente siti di legame dei primers identici a quelli del DNA target dell'HBV ed una regione unica di legame della sonda che permette di distinguere l'amplicone dello standard dall'amplicone del target di HBV del campione. Questo standard di quantificazione viene impiegato come controllo interno al fine di verificare l'efficienza del processo di estrazione e la presenza di eventuali inibitori che possano inficiare la successiva fase di amplificazione.

### Fase di amplificazione e quantificazione

Il test COBAS TaqMan HBV impiega primers di amplificazione che delimitano a monte ed a valle una sequenza della regione pre-core/core altamente conservata del genoma di HBV.

Le sonde oligonucleotidiche con marcatura fluorescente (fluorocromo reporter all'estremità 5' e quencher al 3') specifiche per il DNA di HBV e dello standard di quantificazione sono disegnate per essere complementari ad una sequenza bersaglio all'interno della regione altamente conservata delimitata dai primers garantendo pertanto una quantificazione equivalente di tutti i genotipi virali. Le due sonde differiscono per il fluorocromo reporter al 5'.

L'amplificazione della regione target di HBV avviene grazie all'enzima DNA polimerasi termostabile Z05 derivata dal batterio *Thermus* specie (Z05), mentre la successiva amplificazione selettiva del target avviene mediante l'uso dell'enzima batterico AmpErase (uracile-N-glicosilasi) e dideossiuridinatrifosfato (dUTP).

In breve, i campioni estratti vengono aggiunti alla miscela di amplificazione (master mix) costituita dai primers specifici, dalle sonde oligonucleotidiche fluorescenti specifiche, dagli enzimi di amplificazione (Z05 e AmpErase) e dai deossinucleotidi trifosfati (dNTP; in particolare dATP, dCTP, dGTP, dUTP); inoltre viene aggiunta un'opportuna quantità di soluzione di manganese per adiuvarne la reazione di amplificazione. Ogni miscela di reazione viene incubata nel termociclatore dell'analizzatore COBAS TaqMan 48 affinché specifiche variazioni cicliche di temperatura corrispondenti alle fasi di denaturazione, annealing ed estensione della reazione di PCR portino all'amplificazione esponenziale della regione target. La rilevazione dei prodotti di PCR avviene grazie alla rilevazione di fluorescenza emessa dalle sonde fluorescenti a doppia marcatura durante la fase esponenziale dell'amplificazione. L'amplificazione del DNA di HBV presente nel campione e quella del DNA dello standard di quantificazione sono misurate indipendentemente a diverse lunghezze d'onda poiché le rispettive sonde presentano reporter differenti. L'intensità dei segnali di fluorescenza è correlata alla quantità di materiale originariamente presente nel campione all'inizio della PCR. La concentrazione di DNA di HBV presente nel campione, espressa in unità internazionali (UI/ml), viene quantificata sulla base della concentrazione di HBV-DNA dello standard di quantificazione.

Secondo quanto dichiarato dal produttore, il test COBAS® TaqMan® HBV è in grado di rilevare il DNA virale in siero e plasma con EDTA a concentrazioni minime di 5.9 UI/ml con un tasso di positività superiore al 95%. Inoltre, il test fornisce una risposta lineare a partire da 29 (Log10 = 1.46) UI/ml ad almeno 1,10E8 (Log10 = 8.04) UI/ml di HBV-DNA.

Per ogni seduta analitica di real-time PCR devono essere testati il controllo negativo ed i due controlli positivi (alto e basso positivo) preparati durante la precedente fase di estrazione.

Affinché una seduta analitica possa essere considerata valida occorre rispettare i seguenti criteri di validazione:

- nel controllo negativo non deve essere rilevata la presenza di HBV-DNA (eccetto il DNA dello standard di quantificazione);
- i controlli positivi devono avere concentrazioni di HBV-DNA comprese nel range di accettabilità indicato dalla scheda tecnica fornita dal kit;
- nessun campione deve dare un risultato invalido.



I risultati della quantificazione mediante COBAS TaqMan HBV Test devono essere interpretati come riportato in Tabella 4.

<b>Risultato</b>	<b>Descrizione</b>
<b>Target Not Detected</b>	Valore di Ct per HBV al di fuori del limite del saggio oppure nessun valore di Ct ottenuto per HBV. <b>Riportare i risultati come "DNA di HBV non rilevato".</b>
<b>&lt; 6.00E+00 UI/ml</b> (6 UI/ml)	Le UI/ml calcolate sono inferiori all'intervallo del saggio. <b>Riportare i risultati come "DNA di HBV rilevato, inferiore a 6 UI/ml di HBV-DNA".</b>
<b>≥ 6.00E+00 UI/ml e &lt; 2.90E+01 UI/ml</b> (≥ 6 UI/ml e 29 UI/ml)	I risultati sono minori del limite inferiore dell'intervallo lineare del test. <b>Questi risultati sono validi, ma hanno un grado elevato di variabilità e quindi non possono essere considerati accurati.</b>
<b>≥ 2.90E+01 UI/ml e ≤ 1.10E+08 UI/ml</b> (≥ 29 UI/ml e 110,000,000 UI/ml)	<b>I risultati maggiori o uguali a 29 UI/ml e minori o uguali a 110,000,000 UI/ml rientrano nell'intervallo lineare dell'analisi.</b>
<b>&gt; 1.10E+08 UI/ml</b> (> 110,000,000 UI/ml)	Le UI/ml calcolate sono sopra l'intervallo del saggio. <b>Riportare i risultati come "più di 1.10E+08 UI/ml di HBV-DNA".</b> Se si desiderano risultati quantitativi precisi, il campione originario deve essere diluito con plasma o siero umani HBV-negativi a seconda della matrice del campione originario ed il test deve essere ripetuto.

Tabella 4: Interpretazione dei risultati ottenuti con COBAS TaqMan HBV Test.

## Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata condotta con l'impiego del software Stata Statistical versione 3.1.

Per l'età della popolazione arruolata è stata calcolata media e mediana con deviazione standard (DS) e range (valore minimo - valore massimo).

È stata confrontata la concentrazione degli anticorpi anti-HBs delle due coorti in studio con l'impiego del test non parametrico di Mann-Whitney. In caso di concentrazione non rilevabile (0.0 UI/l) è stato assegnato un valore arbitrario di 0.05 UI/l al fine di permettere il calcolo delle medie geometriche dei titoli anticorpali (GMC). Inoltre è stato calcolato l'intervallo di confidenza al 95% (IC 95%), qualora appropriato.

Per il confronto tra le frequenze è stato eseguito il Test del Chi Quadrato o il Test esatto di Fisher. Sono stati considerati come statisticamente significativi valori di  $p < 0.05$ .

## RISULTATI

I risultati ottenuti sono riassunti in Figura 41.

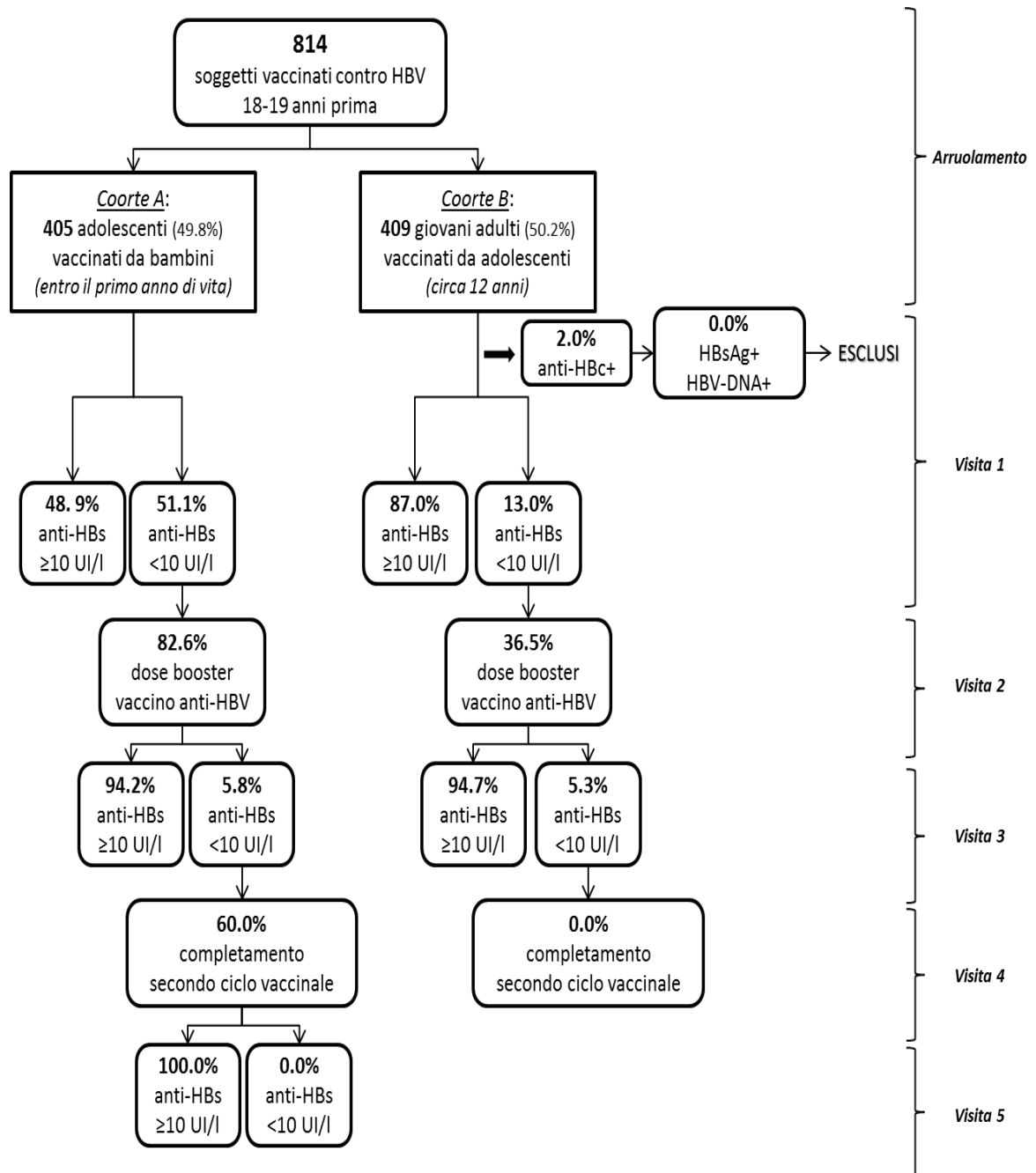


Figura 41: Riassunto dei risultati dello studio.

## Risultati dell'arruolamento: caratteristiche della popolazione

Per questo studio sono stati arruolati 814 soggetti, equamente distribuiti nelle due coorti: 405 ragazzi vaccinati da bambini (49.8%) e 409 giovani adulti vaccinati da adolescenti (50.2%).

Complessivamente la popolazione in studio si suddivideva in maniera equa tra i generi (53% maschi e 47% femmine) ed all'arruolamento presentava un'età media e mediana rispettivamente di 24 e 27 anni (DS 5, range 18-31 anni). I soggetti in studio provenivano prevalentemente dall'Italia centro-settentrionale (74.7%). La terza dose del ciclo vaccinale primario anti-epatite B è stata somministrata tra gli anni 1991-1994 ed il tempo trascorso dall'immunizzazione primaria all'arruolamento risultava in media 18 anni (DS 1, range 16-20).

Le caratteristiche della popolazione in studio suddivisa nelle due coorti sono riassunte in Tabella 5.

<b>Caratteristica</b>	<b>Ragazzi (n=405)</b>	<b>Giovani Adulti (n=409)</b>
<b>Genere</b>		
<i>Maschi</i>	44%	62%
<i>Femmine</i>	56%	38%
<b>Età all'arruolamento</b> (anni) media [DS]		
	19.0 [0.5]	29.3 [1.2]
	19 [18-20]	29 [27-31]
<b>Provenienza</b>		
<i>Centro-Nord</i>	49.1%	100.0%
<i>Sud</i>	28.9%	0.0%
<i>Isole</i>	22.0%	0.0%
<b>Lunghezza follow up</b> (anni) media [SD]		
	18.8 [0.5]	17.9 [1.1]
	19 [18-20]	18 [16-20]

Tabella 5: Caratteristiche della popolazione in studio nelle due coorti.

## **Risultati visita 1: anti-HBs test 1 (pre-booster) ed anti-HBc**

È stata rilevata la presenza di anti-HBc in 8 individui tutti appartenenti al gruppo dei giovani adulti (2.0%).

Quasi tutti i soggetti anti-HBc positivi avevano titolo anticorpale  $\geq 10$  UI/l a distanza di 18 anni dal ciclo vaccinale primario anti-epatite B (n=7); la concentrazione degli anticorpi anti-HBs per ogni soggetto anti-HBc positivo è riassunta in Tabella 6.

<b>Soggetto anti-HBc +</b>	<b>Concentrazione anti-HBs visita 1 - pre-booster (UI/l)</b>
1	0.0
2	13.0
3	95.0
4	503.0
5	704.0
6	>1000.0
7	>1000.0
8	>1000.0

*Tabella 6: Concentrazione anti-HBs visita 1 (pre-booster) in soggetti anti-HBc positivi.*

Per nessun soggetto risultato positivo agli anticorpi contro l'antigene del core è stata rilevata la presenza di HBsAg e HBV-DNA.

Gli 8 soggetti anti-HBc positivi sono stati esclusi dalle successive fasi di analisi dei risultati dello studio.

Complessivamente, il 67.9% (547/806) dei soggetti inclusi nello studio mostrava titoli anticorpali protettivi (anti-HBs  $\geq 10$  UI/l) dopo 18-19 anni dall'immunizzazione primaria con vaccino monovalente ricombinante anti-epatite B. In particolare la sieroprotezione è stata riscontrata per l'87.0% (349/401) del gruppo dei giovani adulti, ma per solo il 48.9% (198/405) del gruppo dei ragazzi (p<0.001) (Tabella 7).

Le medie geometriche anticorpali erano significativamente più elevate nel gruppo dei giovani adulti rispetto a quello dei ragazzi (102.5 UI/l vs 6.9 UI/l, p<0.001) (Tabella 7).

Inoltre, dei soggetti con concentrazione di anti-HBs <10 UI/l (259/806 o 32.1%), il 14.6% (118/806) aveva un titolo anticorpale al di sotto del limite di rilevazione del metodo (2 UI/l); la quota di questa stessa tipologia di soggetti, risultava significativamente differente tra i due gruppi (102/405 o 25.2% tra i ragazzi vs 16/401 o 4.0% tra i giovani adulti,  $p<0.001$ ) (Tabella 7).

Concentrazione anti-HBs Test 1 pre-booster (UI/l)	Soggetti inclusi nello studio (n=806)		p value
	Ragazzi (n=405) n. (%)	Giovani Adulti (n=401) n. (%)	
<2.0	102 (25.2)	16 (4.0)	<0.001
2.0 - 9.9	105 (25.9)	36 (9.0)	
<b>Totale &lt;10</b>	207 (51.1)	52 (13.0)	
<b>10.0 - 100.0</b>	150 (37.0)	114 (28.4)	
<b>100.1 - 1000.0</b>	45 (11.1)	174 (43.4)	
>1000.0	3 (0.8)	61 (15.2)	
<b>Totale ≥10</b>	198 (48.9)	349 (87.0)	
<b>GMC (IC95%)</b>	6.9 (5.4-8.8)	102.5 (83.6-125.7)	<0.001

Tabella 7: Concentrazione di anti-HBs pre-booster per i soggetti inclusi nello studio.

## **Risultati visita 2: somministrazione del booster**

Dei 259 soggetti inclusi nello studio con concentrazione di anti-HBs non protettiva (<10 UI/l), 190 (73.4%) (171/207 o 82.6% nel gruppo dei ragazzi e 19/52 o 36.5% nel gruppo dei giovani adulti) hanno accettato di proseguire il follow-up e ricevere una dose booster di vaccino anti-epatite B per valutare la risposta anamnestic e l'eventuale persistenza di memoria immunologica (Tabella 8).

Booster	Soggetti con concentrazione anti-HBs pre-booster <10 UI/l (n=259)	
	Ragazzi n. (%)	Giovani Adulti n. (%)
Si	171 (82.6)	19 (36.5)
No	36 (17.4)	33 (63.5)
<b>Tot</b>	207 (100.0)	52 (100.0)

Tabella 8: Somministrazione del booster tra i soggetti risultati anti-HBs <10 UI/l pre-booster.

### **Risultati visita 3: anti-HBs test 2 (post-booster)**

Circa 2 settimane dopo la somministrazione del booster, il 94.2% (179/190) dei soggetti che aveva perso la protezione anticorpale pre-booster ha mostrato la persistenza della memoria immunologica post-booster sviluppando una risposta anticorpale anamnestic. Le risposte anticorpali nei due gruppi studiati non presentavano differenza statisticamente significativa: 161/171 o 94.2% nel gruppo dei ragazzi versus 18/19 o 94.7% nel gruppo dei giovani adulti (p=n.s.) (Tabella 9).

Nessuna differenza statistica è stata inoltre riscontrata tra le medie geometriche anticorpali calcolate nei due gruppi (477.9 UI/l vs 710.0 UI/l, p=n.s.) (Tabella 9).

Concentrazione anti-HBs Test 2 post-booster (UI/l)	Soggetti a cui è stato somministrato il booster (n=190)		p value
	Ragazzi (n=171) n. (%)	Giovani Adulti (n=19) n. (%)	
<10	10 (5.8)	1 (5.3)	n.s.
≥10	161 (94.2)	18 (94.7)	
<b>GMC (IC95%)</b>	<b>477.9 (298.8-635.5)</b>	<b>710.0 (273.0-1846.8)</b>	n.s.

Tabella 9: Concentrazione anti-HBs post-booster.

Valutando la concentrazione di anti-HBs post-booster in relazione alla concentrazione di anti-HBs pre-booster, nel gruppo dei ragazzi è stato osservato che all'aumentare del titolo anticorpale pre-booster aumentava la risposta anamnestic post-booster (Tabella 10).

In particolare, la maggior parte dei soggetti che hanno mantenuto un livello anticorpale non protettivo post-booster presentavano un titolo di anti-HBs pre-booster al di sotto del limite di rilevazione del metodo (7/10 o 70.0%), mentre la quasi totalità dei soggetti con anti-HBs pre-booster ≥2 UI/l ha mostrato una concentrazione di anti-HBs post-booster non solo superiore al livello protettivo (79/82 o 96.3%), ma addirittura >100 UI/l (77/82 o 93.9%) (Tabella 10).

Concentrazione anti-HBs Test 1 pre-booster (UI/l)	Concentrazione anti-HBs Test 2 post-booster (UI/l)					GMC UI/l
	<10 n. (%)	10.0 - 100.0 n. (%)	100.1 - 1000.0 n. (%)	>1000.0 n. (%)	Totale n.	
<2.0	7 (7.9)	24 (27.0)	40 (44.9)	18 (20.2)	89	180.4
2.0 -9.9	3 (3.7)	2 (2.4)	31 (37.8)	46 (56.1)	82	1375.3
<b>Totale &lt;10</b>	<b>10 (5.9)</b>	<b>26 (15.2)</b>	<b>71 (41.5)</b>	<b>64 (37.4)</b>	<b>171</b>	<b>477.9</b>

Tabella 10: Concentrazione anti-HBs post-booster correlata a quella pre-booster nel gruppo dei ragazzi.

Lo stesso trend è stato osservato per il gruppo dei giovani adulti (Tabella 11). L'unico soggetto con anti-HBs post-booster <10 UI/l apparteneva al sottogruppo con concentrazione anticorpale pre-booster al di sotto del limite di rilevazione del metodo. Al contrario, tutti coloro che avevano anti-HBs pre-booster  $\geq 2$  UI/l hanno presentato memoria immunologica post-booster, in particolare la quasi totalità ha mostrato una concentrazione di anti-HBs >100.0 UI/l (13/14 o 92.9%) con un 50% di casi (7/14) in cui è stata osservata una risposta anamenstica post-booster superiore alle 1000.0 UI/l (Tabella 11).

Concentrazione anti-HBs Test 1 pre-booster (UI/l)	Concentrazione anti-HBs Test 2 post-booster (UI/l)					Totale	GMC UI/l
	<10 n. (%)	10.0 - 100.0 n. (%)	100.1 - 1000.0 n. (%)	>1000.0 n. (%)			
<2	1 (20.0)	1 (20.0)	3 (60.0)	0 (0.0)	5	159.0	
2.0 - 9.9	0 (0.0)	1 (7.1)	6 (42.9)	7 (50.0)	14	1211.7	
<b>Totale &lt;10</b>	<b>1 (5.3)</b>	<b>2 (10.5)</b>	<b>9 (47.4)</b>	<b>7 (36.8)</b>	<b>19</b>	<b>710.0</b>	

Tabella 11: Concentrazione anti-HBs post-booster correlata a quella pre-booster nel gruppo dei giovani adulti.

#### **Risultati visita 4: secondo ciclo vaccinale**

Dopo circa 2 settimane dalla somministrazione del booster, il 5.8% (11/190) dei soggetti in studio (10/171 o 5.8% ragazzi vs 1/19 o 5.3% giovani adulti) ha mostrato concentrazioni di anti-HBs al di sotto della concentrazione protettiva (<10 UI/l) (Tabella 9). A questi soggetti è stata proposta la somministrazione di due dosi aggiuntive di vaccino ricombinante monovalente anti-epatite B per completare una seconda serie di immunizzazione. Sei soggetti (6/11 o 54.5%), tutti appartenente al gruppo dei ragazzi, hanno accettato di completare il ciclo vaccinale secondario (Tabella 12).

Ciclo vaccinale secondario	Soggetti con concentrazione anti-HBs post-booster <10 UI/l (n=11)	
	Ragazzi n. (%)	Giovani Adulti n. (%)
si	6 (60.0)	0 (0.0)
no	4 (40.0)	1 (100.0)
<b>Tot</b>	<b>10 (100.0)</b>	<b>1 (100.0)</b>

Tabella 12: Somministrazione del ciclo vaccinale secondario tra i soggetti anti-HBs <10 UI/l post-booster.

### **Risultati visita 5: anti-HBs test 3 (post-ciclo vaccinale secondario)**

Circa 1-3 mesi dopo la somministrazione della terza dose della seconda serie di vaccinazione anti-epatite B, tutti i vaccinati sono risultati sieroprotetti (anti-HBs  $\geq 10$  UI/l) con concentrazioni di anti-HBs comprese tra 48.2 e 977.0 UI/l: in particolare, 4 soggetti (66.7%) hanno sviluppato concentrazioni anticorpali superiori a 100 UI/l mentre 2 (33.3%) avevano titolo di anti-HBs tra 10 e 100 UI/l (Tabella 13).

<b>Soggetto</b>	<b>Concentrazione anti-HBs post-booster</b>	<b>Concentrazione anti-HBs post-ciclo vaccinale secondario</b>
<i>n.</i>	<i>(UI/l)</i>	<i>(UI/l)</i>
1	0.0	48.2
2	0.0	78.9
3	2.9	196.0
4	4.3	604.1
5	5.4	977.0
6	5.8	234.4

*Tabella 13: Concentrazione di anti-HBs 2 settimane post-booster ed 1-3 mesi post-ciclo vaccinale secondario.*



# *STUDIO 2:*

*Valutazione dell'immunogenicità a lungo termine contro il virus dell'epatite B conferita dai vaccini esavalenti sul territorio italiano*

## **STUDIO 2: Valutazione dell'immunogenicità a lungo termine contro il virus dell'epatite B conferita dai vaccini esavalenti sul territorio italiano**

### **PREMESSA**

I vaccini esavalenti Hexavac (Sanofi Pasteur MSD) ed Infanrix Hexa (Glaxo Smith Kline GSK) sono stati introdotti in Italia nel 2000-2001. Nel 2005 l'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) in seguito alle raccomandazioni dell'EMA (European Medicines Agency) ha disposto la sospensione e successivamente nel 2012 il ritiro dal commercio del vaccino Hexavac poiché ritenuto responsabile di indurre una risposta immunogenica ridotta contro l'epatite B; nessun provvedimento è stato preso nei confronti dell'altro vaccino esavalente, la cui immunogenicità non è stata messa in discussione<sup>303-305</sup>. Il ritiro dal commercio del vaccino Hexavac ha avuto un impatto rilevante sul territorio italiano poiché, fino al momento della sospensione, il vaccino era stato impiegato per l'immunizzazione di circa il 50% delle coorti di bambini nati negli anni 2003-2004.

Uno studio italiano effettuato a distanza di 5 anni dalla somministrazione del ciclo di immunizzazione primaria con vaccini esavalenti ha evidenziato che non era necessaria la somministrazione di una dose di richiamo di vaccino anti-epatite B. Nonostante all'arruolamento la proporzione di bambini con titoli anticorpali protettivi (anti-HBs  $\geq 10$  UI/l) fosse significativamente più bassa tra coloro che erano stati immunizzati con Hexavac rispetto a quelli immunizzati con Infanrix Hexa (38.4% vs 83.2%  $p < 0,0001$ ), nessuna differenza era emersa tra i due gruppi in termini di risposta anamnestică ad una dose booster somministrata a bambini con titoli anticorpali non protettivi (92.1% vs. 94.3%  $p = 0.4$ )<sup>347</sup>. Tuttavia, tali risultati sono relativi ad un controllo effettuato a distanza di soli 5 anni dal completamento del ciclo primario di vaccinazione; ulteriori studi di follow-up erano dunque necessari per monitorare i bambini vaccinati con vaccino esavalente, in special modo quelli vaccinati con Hexavac, verificando che la memoria immunologica fosse in grado di persistere nel tempo.

Si è reso dunque necessario intraprendere uno studio per valutare la persistenza dell'immunità umorale e cellulare contro il virus dell'epatite B a distanza di almeno 10 anni dalla vaccinazione primaria in due coorti di soggetti immunizzati nel primo anno di vita con un ciclo vaccinale completo con uno dei due vaccini esavalenti (una coorte vaccinata con Hexavac ed una coorte con Infanrix Hexa). In particolare, si è voluto valutare se all'inizio dell'adolescenza, ovvero quando aumenta il rischio di esposizione al patogeno, sia necessaria la somministrazione di una dose booster di vaccino anti-epatite B oppure addirittura un ciclo vaccinale completo per garantire protezione a lungo termine nei soggetti vaccinati 10 anni prima con vaccino esavalente Hexavac, ritenuto responsabile di indurre una risposta immunogenica ridotta contro HBV.

## **OBIETTIVI DELLO STUDIO**

### *Obiettivo primario:*

Determinare la percentuale di soggetti che, a distanza di almeno 10 anni dall'immunizzazione primaria avvenuta nel primo anno di vita con ciclo vaccinale completo costituito da 3 dosi di vaccino esavalente Hexavac (5 µg HBsAg) o Infanrix Hexa (10 µg HBsAg), presentavano livelli anticorpali protettivi (anti-HBs  $\geq 10$  UI/l) contro il virus dell'epatite B un mese dopo la somministrazione di una dose challenge di vaccino ricombinante monovalente anti-epatite B (HBVAXPRO 5µg/0.5ml).

### *Obiettivi secondari:*

- a. valutare l'immunogenicità dei vaccini esavalenti determinando:
  - la frequenza di anticorpi anti-HBs, prima ed un mese dopo la somministrazione di una dose booster di vaccino monovalente anti-epatite B (HBVAXPRO 5 µg), in tutta la popolazione inclusa nello studio e, più in dettaglio, nelle due coorti (Hexavac ed Infanrix Hexa) e nei due rispettivi sottogruppi (anti-HBs  $< 10$  UI/l ed anti-HBs  $\geq 10$  UI/l);
  - le medie geometriche anticorpali (GMC), prima ed un mese dopo la somministrazione di una dose booster di vaccino monovalente anti-epatite B (HBVAXPRO 5 µg), in entrambe le coorti (Hexavac ed Infanrix Hexa) ed in ciascuno dei due rispettivi sottogruppi (anti-HBs  $< 10$  UI/l ed anti-HBs  $\geq 10$  UI/l);
  - il rapporto tra le GMC post-/pre-booster (GMCR) in entrambe le coorti (Hexavac ed Infanrix Hexa) e nei due rispettivi sottogruppi (anti-HBs  $< 10$  UI/l ed anti-HBs  $\geq 10$  UI/l).
  
- b. valutare il profilo di sicurezza del vaccino ricombinante monovalente anti-epatite B impiegato come challenge (una dose di HBVAXPRO 5µg/0.5ml); in particolare determinando complessivamente ed in ciascuna coorte:
  - la percentuale di soggetti con reazione avverse sollecitate (eritema, gonfiore, dolore) nel sito di iniezione del vaccino e con piressia (temperatura corporea  $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ ) a 0-4 giorni dalla somministrazione del vaccino;
  - la percentuale di soggetti con reazioni avverse non sollecitate nel sito di iniezione del vaccino e con reazioni avverse sistemiche nel periodo 0-14 giorni dalla somministrazione del vaccino;
  - la percentuale di soggetti con eventi avversi severi nel periodo compreso tra la somministrazione del vaccino e la fine dello studio.

## DISEGNO DELLO STUDIO

È stato condotto un trial clinico di fase III, aperto, multicentrico e controllato in due coorti di pre-adolescenti sani con documentata storia vaccinale corrispondente a 3 dosi di immunizzazione primaria con vaccino esavalente Hexavac (5 µg HBsAg) o Infanrix Hexa (10 µg HBsAg) somministrate a 3, 5 e 11 mesi di vita.

Nel corso dello studio è stata somministrata per via intramuscolare nella regione deltoidea una dose di vaccino anti-epatite B monovalente (HBVAXPRO 5µg/0.5ml) impiegato come challenge. Sono stati considerati sieroprotetti contro il virus dell'epatite B i soggetti con concentrazione di anticorpi anti-HBs  $\geq 10$  UI/l, sia in fase pre-challenge sia post-challenge.

Ciascuna coorte in studio è stata quindi suddivisa in due sottogruppi in base alla concentrazione di anticorpi anti-HBs ( $<10$  UI/l e  $\geq 10$  UI/l) determinata nel corso dello studio (Figura 42).

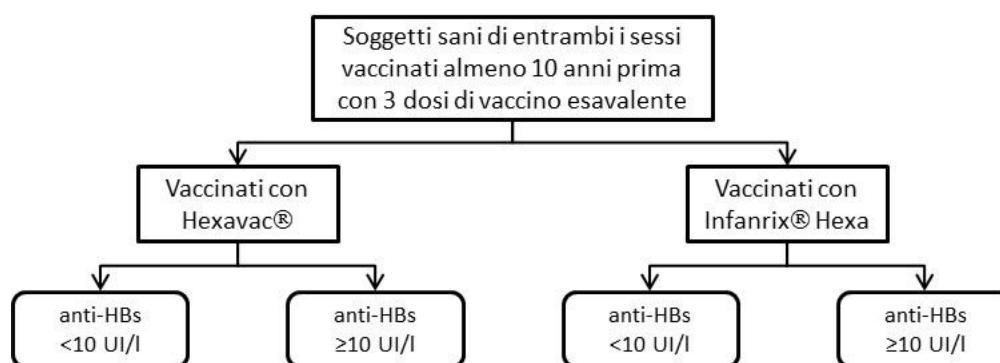


Figura 42: Popolazione dello studio.

Lo studio ha coinvolto 8 ASL (Azienda Sanitaria Locale) dislocate sul territorio italiano ed il Laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute dell'Università degli Studi di Milano, quale laboratorio di riferimento.

A seguito di consultazione dei registri vaccinali delle ASL, i genitori o i tutori legali dei soggetti potenzialmente idonei all'arruolamento nello studio sono stati contattati ed informati (telefonicamente, via email, per posta ordinaria o durante visita di routine presso la ASL) dell'opportunità di partecipare volontariamente al trial clinico illustrando loro la possibilità di abbandonare il trial in qualsiasi momento e senza effetti negativi in caso di rifiuto o abbandono (*fase*

*pre-studio*). I soggetti selezionati sono stati invitati a presentarsi presso la ASL per l'arruolamento e l'effettiva partecipazione allo studio.

Lo studio si è quindi articolato in 3 fasi, suddivise in 2 distinti periodi temporali:  $T_0$  = giorno 0 e  $T_1$  = 20-30 giorni dopo  $T_0$ . In particolare:

1) *Arruolamento ( $T_0$  = giorno 0)*

In ciascuna ASL è stata reclutata la popolazione in studio da suddividere in due coorti, comparabili per età e sesso, costituite ciascuna da pre-adolescenti di circa 12-13 anni vaccinati almeno 10 anni prima rispettivamente con 3 dosi di vaccino esavalente Hexavac o Infanrix Hexa somministrate nel primo anno di vita (3, 5, 11 mesi di vita).

All'atto dell'arruolamento i candidati dovevano soddisfare i seguenti criteri di inclusione:

- soggetti sani di entrambi i sessi nati da madre HBsAg negativa;
- ciclo vaccinale primario completo e documentato con 3 dosi di vaccino Hexavac (5 µg HBsAg) o Infanrix Hexa (10 µg HBsAg) di cui la terza dose somministrata almeno 10 anni prima della somministrazione della dose booster di vaccino ricombinante monovalente anti-epatite B in studio (HBVAXPRO 5µg/0.5ml);
- ogni soggetto ed i rispettivi genitori o tutori legali dovevano aver compreso pienamente le procedure dello studio ed i rischi ad esso associati dando il proprio consenso a partecipare volontariamente, fornendo rispettivamente il proprio assenso verbale ed il proprio consenso informato scritto.

Non potevano, invece, partecipare allo studio soggetti che presentano uno o più dei seguenti criteri di esclusione:

- ciclo vaccinale primario con più di 3 dosi di vaccino esavalente;
- ciclo vaccinale primario con vaccino anti-epatite B diverso dagli esavalenti in studio;
- diagnosi clinica di pregressa infezione di epatite B;
- contatto, recente o passato, con portatori del virus dell'epatite B;
- ipersensibilità o allergie note ai componenti del vaccino ricombinante anti-epatite B (in particolare HBVAXPRO 5 µg in quanto somministrato come challenge);
- neoplasie del sistema emopoietico e/o linfatico in atto;
- disordini della coagulazione per le quali è controindicata un'iniezione intramuscolare (in quanto nel corso dello studio, a tutti i partecipanti, era prevista la somministrazione di una dose di vaccino HBVAXPRO 5µg/0.5ml);
- patologie croniche o deficit del sistema immunitario;
- trasfusioni di sangue o somministrazione di immunoglobuline o emoderivati nei 3 mesi antecedenti alla somministrazione della dose challenge di vaccino ricombinante monovalente anti-epatite B in studio (HBVAXPRO 5 µg);
- partecipazione ad altro trial clinico durante il periodo del presente studio.

Sono stati considerati come criteri di esclusione temporanea allo studio, con possibilità di entrare in studio a seguito del loro decadimento, le sottostanti condizioni:

- stato febbrile (con temperatura corporea  $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ ) registrato al momento stesso dell'arruolamento o riportato nei 3 giorni antecedenti la somministrazione della dose challenge di vaccino ricombinante monovalente anti-epatite B in studio (HBVAXPRO 5  $\mu\text{g}$ );
- somministrazione sistematica e ripetuta ( $\geq 14$  giorni) di dosi di corticosteroidi nei 30 giorni precedenti la somministrazione del challenge;
- inoculazione di un vaccino inattivato o vivo attenuato rispettivamente 14 e 28 giorni prima la somministrazione del challenge anti-epatite B.

## 2) *Visita 1 (T0 = giorno 0)*

A seguito dell'arruolamento, nelle ASL sono stati raccolti su apposito modulo informatizzato (scheda di raccolta dati e-CRF) i dati socio-demografici e le informazioni riguardanti la storia vaccinale e la storia medica di ciascun soggetto reclutato. Per documentare la storia vaccinale di ogni soggetto in studio sono stati consultati i registri di vaccinazione delle ASL e le tessere vaccinali dei singoli soggetti. Su scheda e-CRF sono state archiviate informazioni riguardanti la tipologia di vaccino esavalente impiegato per l'immunizzazione primaria (Hexavac o Infanrix Hexa) e la data di somministrazione di ogni singola dose. Per quanto concerne la storia medica, sono state registrate informazioni in merito a terapie farmacologiche o trattamenti e cure di qualsiasi natura (esclusi trattamenti omeopatici, integratori alimentari, prodotti per risciacqui locali e trattamenti fitoterapici) antecedenti (entro 7 giorni) e/o concomitanti alla somministrazione del challenge. In particolare sono stati documentati il nome commerciale dei prodotti assunti, la via di somministrazione, la dose, la data di inizio ed eventualmente la data di fine trattamento.

Inoltre, ad ogni partecipante allo studio è stato assegnato e riportato sulla scheda personale e-CRF un numero di identificazione, al fine di anonimizzare tutti i soggetti arruolati. Il numero identificativo è stato assegnato in maniera consequenziale all'arruolamento, dal numero più piccolo al più grande. Ad uno stesso soggetto è stato assegnato un solo ed unico codice identificativo.

Ad ogni soggetto arruolato è stato quindi effettuato un primo prelievo di sangue (BS01), seguito dalla somministrazione di una dose challenge di vaccino ricombinante monovalente anti-epatite B (HBVAXPRO 5 $\mu\text{g}$ /0.5ml). Il campione di siero, prelevato e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$ , è stato inviato al laboratorio di riferimento (Laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute dell'Università degli Studi di Milano) per la quantificazione pre-challenge degli anticorpi contro anti-HBs. La somministrazione del challenge è avvenuta per via intramuscolare nella regione deltoidea e tutti i riceventi sono stati tenuti sotto

sorveglianza medica per almeno 20 minuti post-iniezione, per rilevare eventuali eventi avversi immediati.

Infine, ai genitori o tutori legali di ciascun partecipante al trial clinico è stata consegnata ed illustrata la modalità di compilazione di un'apposita scheda-diario sulla quale annotare qualsiasi evento avverso insorto entro il quattordicesimo giorno dalla somministrazione del challenge. In particolare, è stato chiesto di segnalare l'eventuale presenza di eritema, gonfiore, dolore e/o piressia ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) verificatisi entro i primi quattro giorni dalla somministrazione del challenge, qualsiasi altra reazione avversa non sollecitata nel sito di iniezione e qualsiasi evento avverso sistemico non sollecitato manifestatosi entro il quattordicesimo giorno dal challenge. Sulla scheda-diario dovevano inoltre essere riportati eventuali trattamenti o farmaci assunti nel periodo compreso tra la prima e la seconda visita dello studio.

### 3) *Visita 2 (T1 = 20-30 giorni dopo T0)*

A distanza di circa 20-30 giorni (massimo 35 giorni) dalla prima visita, è stato effettuato un secondo prelievo di sangue (BS02), il cui siero è stato inviato al laboratorio di riferimento per la quantificazione post-challenge degli anticorpi anti-HBs. Sul secondo prelievo sono stati anche testati i marcatori di infezione dell'epatite B, ovvero la determinazione qualitativa degli anticorpi contro l'antigene virale del core (anti-HBc) e, se positivi, la determinazione qualitativa dell'antigene di superficie del virus (HBsAg) e la determinazione quantitativa del genoma virale (HBV-DNA). I soggetti con positività per uno dei marcatori di infezione da HBV sono stati esclusi dalla valutazione dell'immunogenicità a lungo termine dei vaccini esavalenti, in quanto individui con perdita dei criteri di inclusione allo studio per sospetta infezione da HBV insorta precedentemente lo studio, seppur non diagnosticata.

In occasione della seconda visita, da parte del personale delle ASL sono state raccolte e revisionate tutte le schede-diario consegnate ai genitori/tutori legali durante la prima visita. Tutte le informazioni riportate sulla scheda-diario di ciascun soggetto sono state quindi registrate sulla rispettiva scheda e-CRF. È stata anche verificata ed eventualmente riportata sulla scheda e-CRF la somministrazione tra prima e seconda visita di trattamenti non consentiti durante lo studio, e che avrebbero portato all'esclusione del soggetto dal trial clinico, ovvero somministrazione di terapie immunosoppressive, corticosteroidi sistemici ad alte dosi, immunoglobuline, sangue o emoderivati, farmaci o dispositivi sperimentali e vaccini diversi da quello in studio.

Infine, il personale delle ASL ha verificato le condizioni di buona salute di ciascun soggetto prima del termine dello studio. In presenza di qualsiasi evento avverso (severo o non severo) valutato come connesso alla somministrazione del challenge e persistente al momento della

seconda visita, lo studio prevedeva che i soggetti fossero seguiti dal personale sanitario e scientifico dello studio fino alla completa risoluzione o stabilizzazione dei sintomi.

Solo i soggetti che hanno partecipato a tutte le fasi previste dal protocollo dello studio rispettando i criteri di inclusione/esclusione sono stati inclusi nella popolazione in studio per la valutazione dell'obiettivo primario del trial clinico.

Questo trial clinico è parte del programma di sorveglianza della Sanofi Pasteur MSD per il vaccino HEXAVAC®. Il protocollo dello studio è stato approvato dal comitato etico e lo studio è stato condotto secondo quanto stabilito dalla International Conference on Harmonisation, dagli standard per le Good Clinical Practices e dalla Dichiarazione di Helsinki.

Il disegno dello studio è schematizzato in Figura 43.

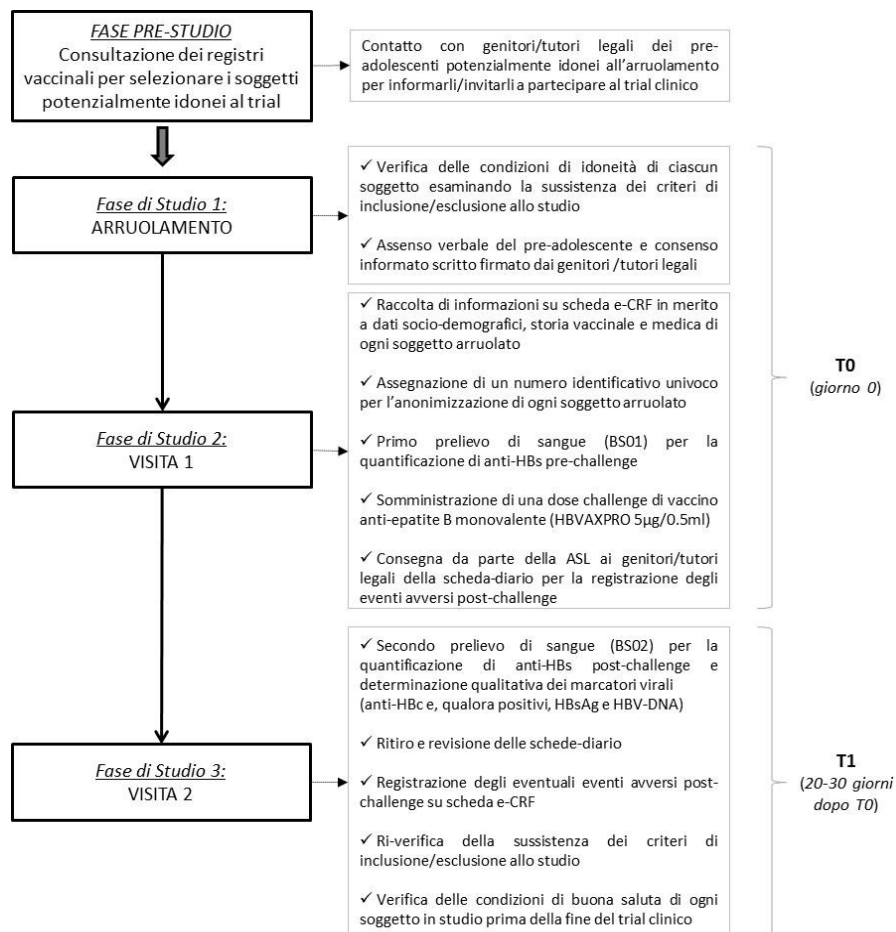


Figura 43: Disegno dello studio.



## **MATERIALI E METODI**

### **Prelievi di sangue**

I prelievi di sangue (BS01 e BS02) per l'esecuzione dei test sierologici e virologici sono stati effettuati nelle ASL da parte di personale qualificato.

Da ciascun soggetto sono stati prelevati, in fase pre-challenge (BS01) ed in fase post-challenge (BS02), circa 5 ml di sangue venoso utilizzando per la raccolta idonee provette da sierologia. Il campione di sangue è quindi stato lasciato a temperatura ambiente al fine di favorire la coagulazione ed in seguito centrifugato per la separazione del siero. Il siero è stato trasferito in apposite provette, ciascuna etichettata con il numero identificativo univoco del soggetto arruolato, e congelato a temperatura  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .

Il campione congelato è stato quindi inviato al laboratorio di riferimento per l'esecuzione dei test di laboratorio per i marcatori di HBV previsti dallo studio.

### **Test sierologici e molecolari**

L'analisi sierologica e molecolare per la ricerca dei marcatori di HBV previsti dallo studio sono stati eseguiti dal Laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute dell'Università degli Studi di Milano. Tutti i test sono stati condotti da personale qualificato che ignorava il tipo di vaccino utilizzato nel ciclo di immunizzazione primaria (*test in cieco*).

Entrambi i prelievi di sangue previsti dallo studio (BS01 e BS02) sono stati testati per la determinazione quantitativa di anticorpi anti-HBs, mentre solo il secondo prelievo (BS02) è stata saggiato per la presenza qualitativa di anticorpi anti-HBc e, qualora positivo, sono stati indagati altri marcatori virali (HBsAg e HBV-DNA).

La determinazione quantitativa di anti-HBs e qualitativa di anti-HBc e HBsAg è stata eseguita attraverso tecniche immunoenzimatiche (kit commerciali AxSYM AUSAB, CORE e HBsAg V2, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) con l'impiego di un analizzatore automatizzato (ABBOTT AxSYM System, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) (Figura 44).

La rilevazione di HBV-DNA è avvenuta mediante real-time PCR, utilizzando un test TaqMan per HBV (COBAS TaqMan HBV Test for use with the High Pure System, Roche, Branchburg, NJ, USA) ed il termociclature dell'analizzatore COBAS TaqMan (Analizzatore COBASTaqMan48, Roche, Branchburg, NJ, USA) (Figura 44).



**ABBOTT AxSYM System**



**Analizzatore COBAS TaqMan 48**

*Figura 44: Strumenti impiegati per test sierologici (a sinistra) e molecolari (a destra).*

Il principio del test e la sua sensibilità analitica, la determinazione e l'interpretazione dei risultati sia dei saggi immunoenzimatici sia delle metodiche di biologia molecolare impiegati in questo studio sono già stati descritti in dettaglio nella precedente sezione “*Materiali e Metodi*” (pagg. 113-126).

### **Valutazione degli eventi avversi post-challenge**

In questo studio, è stato definito evento avverso qualsiasi episodio clinico imprevisto che si è verificato in un soggetto arruolato nel trial clinico a seguito (massimo 14 giorni) della somministrazione di una dose di vaccino monovalente anti-epatite B (HBVAXPRO 5µg/0.5ml). Tuttavia, è opportuno precisare che la comparsa di un evento avverso a seguito di somministrazione di booster non necessariamente implica una relazione causale tra vaccino ed episodio clinico; tale relazione doveva essere stabilita in maniera univoca.

In questo studio, sono stati presi in considerazioni sia reazioni avverse a livello del sito di iniezione (sollecitate e non sollecitate) sia eventi avversi sistemici.

L'intensità degli eventi avversi a livello del sito di iniezione e/o sistemici è stata definita come lieve, moderata o grave secondo i parametri riportati in Tabella 14.

<b>Intensità</b>	<b>Tipologia di evento avverso:</b>		
	<i>Eritema e gonfiore al sito di iniezione</i>	<i>Altre reazioni avverse non sollecitate al sito di iniezione ed eventi avversi sistemici</i>	<i>Febbre (gradi Celsius)</i>
<i>Lieve</i>	≤ 2.5 cm	presenza di sintomatologia ma facilmente tollerabile	≥38.0°C a ≤38.4°C
<i>Moderata</i>	2.5-5.0 cm	sintomatologia sicuramente presente	≥38.5°C a ≤38.9°C
<i>Grave</i>	> 5.0 cm	sofferenza intensa o impossibilità nel svolgere attività usuali	≥39.0°C

Tabella 14: Intensità degli eventi avversi sistemici o al sito di iniezione.

Sono stati considerati eventi avversi seri o gravi gli episodi clinici che corrispondevano ad uno o più dei seguenti criteri:

- esito fatale o pericolo di vita per il soggetto
- ricovero ospedaliero breve o prolungato
- invalidità o incapacità grave o prolungata.

In aggiunta, sono stati inclusi tra gli eventi avversi seri o gravi:

- insorgenza di qualsiasi forma di neoplasia
- episodio di overdose

La relazione causale tra evento avverso e somministrazione del vaccino in studio (HBVAXPRO 5µg/0.5ml) è stata determinata come riportato in Tabella 15.

<b>Tipo di relazione</b>	<b>Descrizione</b>
<b>NESSUNA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- il soggetto non ha ricevuto il vaccino</li> <li>- inconsistenza temporale tra somministrazione del vaccino e comparsa dell'evento avverso</li> <li>- esistenza di un'altra causa più ovvia o probabile che possa aver scatenato l'evento avverso.</li> </ul> <p>L'evento avverso è del tutto non connesso alla somministrazione del vaccino.</p>
<b>POSSIBILE</b>	<p>Relazione temporale tra somministrazione del vaccino ed insorgenza dell'evento avverso, tuttavia esiste un'altra causa altrettanto relazionabile all'insorgenza dell'evento avverso.</p> <p>L'evento avverso sembra possa essere ricondotto alla somministrazione del vaccino.</p>
<b>PROBABILE</b>	<p>Relazione temporale rilevante tra somministrazione del vaccino ed insorgenza dell'evento avverso, la sintomatologia è suggestiva e non esiste apparentemente una potenziale eziologia differente. L'evento avverso è verosimilmente spiegato dall'assunzione del vaccino rispetto ad altra causa.</p>
<b>CERTA</b>	<p>Relazione temporale rilevante tra somministrazione del vaccino ed insorgenza dell'evento avverso, inoltre la sintomatologia è suggestiva e non esiste altra eziologia plausibile. L'evento avverso è spiegato solo in relazione all'assunzione del vaccino.</p>

*Tabella 15: Definizione di relazione causale tra evento avverso e somministrazione del vaccino.*

## **Analisi Statistica**

La dimensione del campione di popolazione in studio è stata calcolata per ottenere una stima reale della frequenza di soggetti con concentrazione di anti-HBs  $\geq 10$  UI/l un mese post-challenge nei sottogruppi delle due coorti in studio (Hexavac vs. Infanrix Hexa), definita secondo la concentrazione di anti-HBs pre-challenge:  $< 10$  UI/l e  $\geq 10$  UI/l. È stato stimato che con 100 soggetti valutabili in ogni sottogruppo l'ampiezza media dell'intervallo di confidenza al 95% (IC 95%) su due code non eccede l'8%, valore ritenuto accettabile per fornire una stima appropriata della reale percentuale di individui in ogni sottogruppo analizzato. Assumendo che circa il 10% dei soggetti arruolati nello studio non fosse stato valutabile al termine del trial clinico (per abbandono durante il follow-up o per insussistenza dei criteri di inclusione allo studio), il numero minimo teorico di individui da arruolare sarebbe stato pari a 448, di cui 224 per ciascuna coorte (Hexavac vs. Infanrix Hexa) e 112 per ciascun

sottogruppo (<10 UI/l pre-challenge vs. ≥10 UI/l pre-challenge), se equamente distribuiti. Tuttavia, dai risultati ottenuti da un precedente studio condotto a 5 anni di distanza dal ciclo vaccinale primario con i due vaccini esavalenti Hexavac ed Infanrix Hexa, ci si aspettava che il sottogruppo più piccolo fosse pari al 30% della popolazione totale della coorte (in particolare 70% nel sottogruppo <10 UI/l e 30% nel sottogruppo ≥10 UI/l della coorte Hexavac vs. 30% nel sottogruppo <10 UI/l e 70% nel sottogruppo ≥10 UI/l della coorte Infanrix Hexa)<sup>347</sup>. Di conseguenza, per questo studio dovevano essere arruolati in ciascuna coorte 375 soggetti (263 nel sottogruppo <10 UI/l e 112 nel sottogruppo ≥10 UI/l della coorte Hexavac vs. 112 nel sottogruppo <10 UI/l e 236 nel sottogruppo ≥10 UI/l della coorte Infanrix Hexa), per un totale di 750 individui in studio, in modo tale da avere circa 100 soggetti valutabili nel sottogruppo più piccolo al termine del trial clinico. Poiché la reale proporzione di soggetti di ogni sottogruppo in ciascuna coorte non era nota, il numero di soggetti con concentrazione di anti-HBs pre-challenge <10 UI/l e ≥10 UI/l è stato monitorato durante il periodo dell'arruolamento ed è stato stabilito che il reclutamento poteva essere interrotto al raggiungimento di 112 individui vaccinati in ogni sottogruppo (<10 UI/l vs. ≥10 UI/l pre-challenge) di ciascuna coorte (Hexavac vs. Infanrix Hexa) fino ad un massimo di almeno 750 soggetti in totale per lo studio.

Per la descrizione delle caratteristiche della popolazione in studio sono stati stabiliti valori medi o mediani di peso, altezza ed età con rispettiva deviazione standard (DS) e/o range (valore minimo - valore massimo).

Per valutare l'immunogenicità a lungo termine dei vaccini esavalenti è stata condotta un'analisi descrittiva della popolazione inclusa nello studio. In particolare, è stata calcolata la frequenza delle concentrazioni di anti-HBs, in fase pre- e post-challenge nell'intera popolazione inclusa nello studio, in entrambe le coorti ed in ciascuno dei due rispettivi sottogruppi, con relativo IC 95% su due code qualora necessario. Inoltre, sono state calcolate le GMC pre- e post-challenge ed il GMCR post-/pre-challenge nelle due coorti in studio ed in entrambi i rispettivi sottogruppi con relativo IC 95% su due code, valore mediano e range (valore minimo - valore massimo). Per il calcolo delle GMC è stato assegnato un valore arbitrario di 5.0 UI/l nei casi in cui il titolo anticorpale risultava <10 UI/l. L'analisi statistica è stata condotta con l'impiego del software SAS Versione V9.3.

Il profilo di sicurezza del vaccino monovalente anti-epatite B utilizzato come challenge (HBVAXPRO 5 µg) è stato descritto in termini di incidenza, intensità, gravità degli eventi avversi e correlazione tra somministrazione del vaccino ed insorgenza di reazioni avverse. Tutte le reazioni avverse nel sito di inoculo sono state considerate correlate al vaccino in studio. Gli eventi avversi sistemici sono stati valutati come vaccino-correlati o non correlati.

## RISULTATI

### Selezione - Arruolamento - Inclusione allo studio

La determinazione della popolazione "arruolata" ed "inclusa" nello studio è brevemente riassunta in Figura 45.

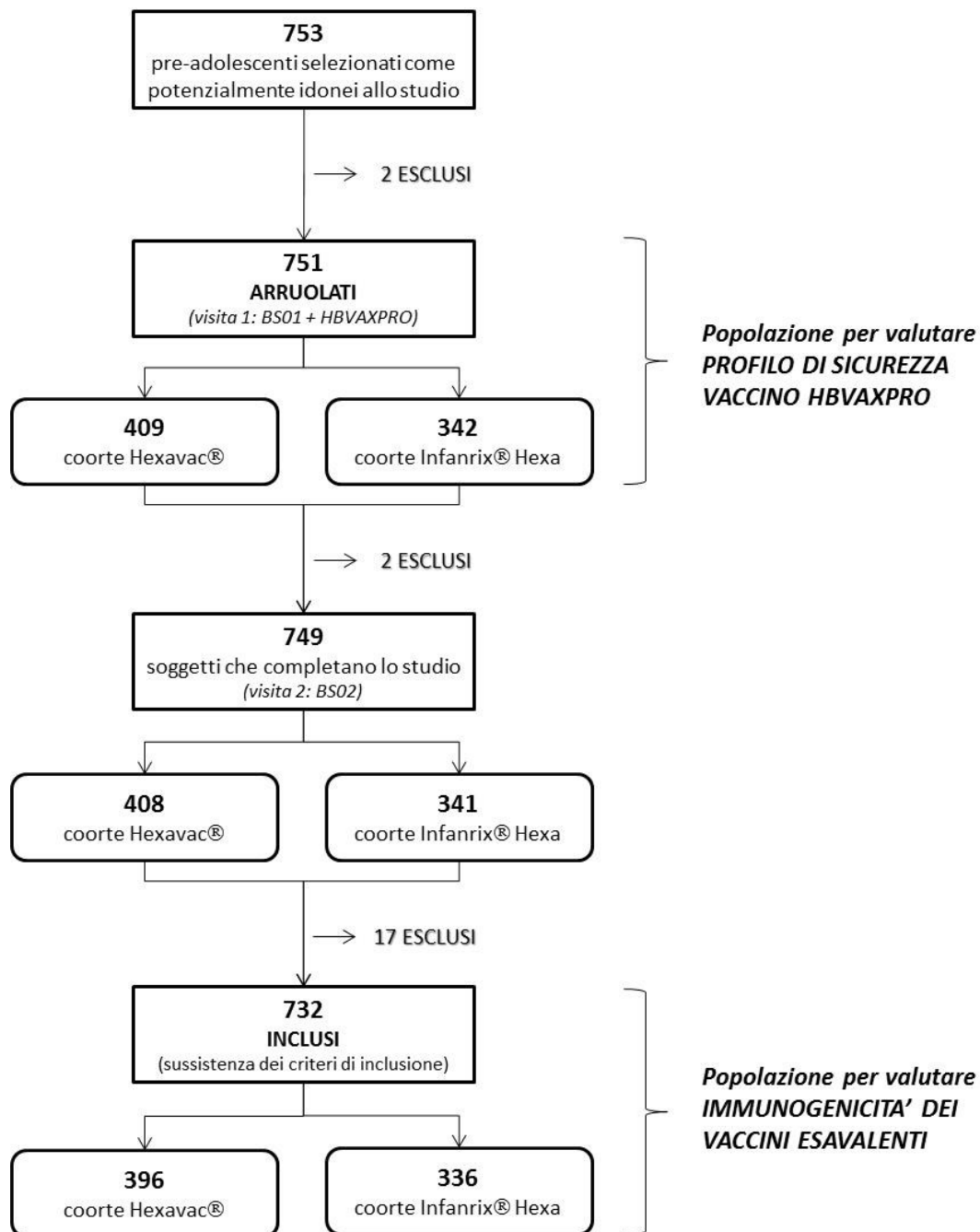


Figura 45: Popolazione arruolata ed inclusa nello studio.

Per questo studio, presso le ASL sono stati selezionati un totale di 753 pre-adolescenti.

All'atto dell'arruolamento, due soggetti (0.3%) sono stati esclusi dal reclutamento per insussistenza dei requisiti di inclusione/esclusione allo studio o per motivi personali. In particolare, ad un soggetto era stato somministrato un vaccino inattivato nei 14 giorni precedenti alla prevista inoculazione della dose booster di vaccino ricombinante monovalente anti-epatite B in studio (HBVAXPRO 5 µg), invece il secondo soggetto rifiutava di sottoporsi a prelievi ematici nel corso della sperimentazione clinica.

Un totale di 751 pre-adolescenti, 409 nella coorte Hexavac (54.5%) e 342 nella coorte Infanrix Hexa (45.5%), sono quindi stati reclutati per il trial clinico e sottoposti alla prima visita prevista dal protocollo dello studio. Tutti gli arruolati hanno ricevuto una dose challenge di vaccino ricombinato monovalente anti-epatite B (HBVAXPRO 5µg/0.5ml), preceduta da un prelievo ematico pre-challenge (BS01). Questo gruppo ha costituito la popolazione "arruolata" nello studio, i cui risultati hanno permesso la valutazione del profilo di sicurezza del vaccino HBVAXPRO.

Dopo circa 20-30 giorni dalla prima visita, 749 soggetti (99.7%), di cui 408 nella coorte Hexavac (54.5%) e 341 nella coorte Infanrix Hexa (45.5%), sono stati sottoposti alla seconda visita ed al prelievo ematico post-challenge (BS02), completando tutte le fasi previste dal protocollo dello studio. Due soggetti (0.3%) sono invece stati persi al follow up: uno per motivi ignoti non si è mai presentato alla seconda visita, l'altro per sopraggiunta ospedalizzazione in una città differente rispetto alla sede di arruolamento determinando l'impossibilità di continuare la partecipazione allo studio.

Dei soggetti che hanno completato il trial clinico, solo 732 (97.7%), di cui 396 nella coorte Hexavac (54.1%) e 336 nella coorte Infanrix Hexa (45.9%), sono stati quindi inclusi nello studio. Tali individui hanno costituito la popolazione "inclusa" nello studio, i cui risultati hanno permesso la valutazione dell'immunogenicità a lungo termine dei vaccini esavalenti.

I motivi di esclusione dall'analisi dei dati degli altri 17 soggetti che hanno completato lo studio sono descritti in Tabella 16.

Motivo di esclusione	Coorte Hexavac (N=408)	Coorte Infanrix Hexa (N=341)	Totale (N= 749)
	<i>n. (%)</i>	<i>n. (%)</i>	<i>n. (%)</i>
Ciclo vaccinale primario non corrispondente a 3 dosi di vaccino Hexavac o Infanrix Hexa	3 (0.7)	0 (0.0)	3 (0.4)
Secondo prelievo di sangue (BS02) effettuato >35 giorni dalla somministrazione del challenge	3 (0.7)	0 (0.0)	3 (0.4)
Terapia immunosoppressiva o somministrazione sistemica di corticosteroidi durante il follow up	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.1)
Sospetta infezione da HBV precedente alla prima visita dello studio	6 (1.5)	4 (1.2)	10 (1.3)
<b>TOTALE</b>	<b>12 (2.9)</b>	<b>5 (1.5)</b>	<b>17 (2.3)</b>

Tabella 16: Motivi di esclusione dallo studio per 17 soggetti che hanno completato tutte le fasi del trial clinico.

Per 7 soggetti (0.9%) l'esclusione è stata determinata da una non conformità con i requisiti di accesso, non conformità con i requisiti per i prelievi ematici oppure inizio di trattamenti medici non autorizzati nel corso dello studio.

Dieci soggetti arruolati (1.3%) sono stati invece esclusi per sospetta infezione da HBV precedente l'inizio della sperimentazione clinica. Per tali individui il sospetto contatto con il virus è stato determinato durante lo studio a seguito di positività riscontrata per i marcatori di HBV al secondo prelievo (BS02) effettuato nel corso dello studio. Tutti questi dieci soggetti sono risultati anti-HBc positivi (10/749 o 1.3%): 6 soggetti (6/408 o 1.5%) appartenevano alla coorte Hexavac e 4 (4/341 o 1.2%) alla coorte Infanrix Hexa. Nessuno presentava evidenze di infezione acuta o cronica da HBV, in quanto risultati HBsAg e HBV-DNA negativi. Seppur esclusi dall'analisi dei dati relativi all'immunogenicità dei vaccini esavalenti, per tali soggetti è stata comunque determinata la concentrazione di anticorpi anti-HBs pre- e post-challenge: 3 soggetti presentavano titoli anticorpali anti-HBs  $\geq 10$  UI/l in entrambi i prelievi, mentre 5 dei 7 individui con anti-HBs  $< 10$  UI/l al prelievo pre-challenge hanno mostrato risposta anamnestic post-challenge (Tabella 17).

Coorte	ID Soggetto	Concentrazione anti-HBs (UI/l)		Anti-HBc	HBsAg	Concentrazione HBV DNA (UI/ml)
		BS01	BS02			
<b>Hexavac</b>	<b>1</b>	<10	864.4	positivo	negativo	negativo
	<b>2</b>	<10	11.6	positivo	negativo	negativo
	<b>3</b>	<10	<10	positivo	negativo	negativo
	<b>4</b>	<10	203.2	positivo	negativo	negativo
	<b>5</b>	<10	<10	positivo	negativo	negativo
	<b>6</b>	18.4	3395	positivo	negativo	negativo
<b>Infanrix Hexa</b>	<b>7</b>	<10	857.9	positivo	negativo	negativo
	<b>8</b>	<10	2063	positivo	negativo	negativo
	<b>9</b>	17.5	2194	positivo	negativo	negativo
	<b>10</b>	92.6	25720	positivo	negativo	negativo

Tabella 17: Soggetti con sospetta progressa infezione da HBV.

### **Caratteristiche della popolazione in studio**

Le caratteristiche socio-demografiche della popolazione arruolata nello studio (n=751) sono risultate comparabili nelle due coorti.

Complessivamente, i soggetti reclutati si suddividono per genere in 44% maschi e 56% femmine. Il valore medio di peso ed altezza degli arruolati è risultato rispettivamente pari a 44.8 kg (DS 11.0) e 151 cm (DS 9).



L'età media della popolazione alla somministrazione della dose challenge di vaccino ricombinato monovalente anti-epatite B in studio (HBVAXPRO 5µg/0.5ml) era pari a 11.9 anni (DS 0.5; range: 10.9-13.4).

L'intervallo di tempo intercorso tra l'ultima dose di vaccino esavalente del ciclo di immunizzazione primaria e la somministrazione della dose booster di vaccino monovalente in studio corrispondeva ad un valore mediano di 10.9 anni (range 10.0-12.3): in particolare, 11.0 anni (range 10.0-12.3) nella coorte Hexavac e 10.8 anni (range 10.0-12.2) nella coorte Infanrix Hexa (Tabella 18).

Le caratteristiche generali del sottogruppo di soggetti inclusi nello studio (n=732) sono risultate complessivamente comparabili a quelle della popolazione arruolata.

<b>Caratteristiche</b>		<b>Popolazione arruolata</b> (N=751)
<b>Genere</b>	<i>Maschi</i>	44%
	<i>Femmine</i>	56%
<b>Età all'arruolamento</b>		
	<i>media anni [DS]</i>	11.9 [0.5]
	<i>(range)</i>	(10.9-13.4)
<b>Intervallo di tempo tra ciclo vaccinale primario e challenge</b>		
	<i>mediana anni</i>	10.9
	<i>(range)</i>	(10.0-12.3)

Tabella 18: Caratteristiche della popolazione arruolata nello studio.

## **Immunogenicità dei vaccini esavalenti**

Per valutare l'immunogenicità a lungo termine dei vaccini esavalenti (Hexavac ed Infanrix Hexa) è stato preso in considerazione il sottogruppo definito popolazione "inclusa" nello studio (N=732), in quanto si tratta di individui che hanno partecipato a tutte le fasi previste dal protocollo soddisfacendo fino al termine del trial clinico i requisiti di inclusione/esclusione.

### **Visita 1: BS01**

A distanza di circa 10 anni dall'immunizzazione primaria con vaccini esavalenti (Hexavac ed Infanrix Hexa) solo il 44.7% (327/732) dei soggetti inclusi nello studio aveva concentrazione protettiva di anticorpi anti-HBs ( $\geq 10$  UI/l), con differenza statisticamente significativa tra le due coorti: 24.0% (95/396) nella coorte Hexavac e 69.0% (232/336) nella coorte Infanrix Hexa (IC 95%: 19.7-28.4 vs 63.8-74.0) (Tabella 19).

<b>Popolazione "inclusa" nello studio</b> <b>per la valutazione dell'immunogenicità a lungo termine dei vaccini esavalenti (N=732)</b>			
<b>Concentrazione anti-HBs pre-challenge (UI/l)</b>	<b>Coorte Hexavac n. (%)</b>	<b>Coorte Infanrix Hexa n. (%)</b>	<b>Totale n. (%)</b>
<b>&lt;10.0</b>	301 (76.0)	104 (31.0)	405 (55.3)
<b>≥10.0</b>	95 (24.0)*	232 (69.0)*	327 (44.7)
<b>Totale</b>	396 (100.0)	336 (100.0)	732 (100.0)

\* IC 95%: 19.7-28.4 Hexavac vs 63.8-74.0 Infanrix Hexa

Tabella 19: Concentrazione di anti-HBs pre-challenge nella popolazione inclusa nello studio.

### Visita 2: BS02

Dopo circa un mese dalla somministrazione della dose challenge di vaccino monovalente anti-epatite B (HBVAXPRO 5µg/0.5ml), la quota complessiva di soggetti con concentrazione di anti-HBs ≥10 UI/l risultava pari a 89.5% (655/732): 83.6% (331/396) nella coorte Hexavac e 96.4% (324/336) in quella Infanrix Hexa (IC 95%: 79.6-87.1 vs 93.8-98.1) (Tabella 20).

Considerando per entrambe le coorti il sottogruppo di soggetti con concentrazione di anti-HBs <10 UI/l in fase pre-challenge, la percentuale di individui con titolo anticorpale protettivo post-challenge (anti-HBs ≥10 UI/l) era inferiore nella coorte dei vaccinati con Hexavac (78.4 o 236/301) rispetto a quelli della coorte dei vaccinati con Infanrix Hexa (88.5% o 92/104) senza però nessuna differenza statisticamente significativa (IC 95%: 73.6-83.2 vs 80.7-93.9) (Tabella 20).

<b>Concentrazione anti-HBs post-challenge (UI/l)</b>	<b>Concentrazione anti-HBs pre-challenge (UI/l)</b>					
	<b>Coorte Hexavac</b>			<b>Coorte Infanrix Hexa</b>		
	<b>&lt;10.0 n. (%)</b>	<b>≥10.0 n. (%)</b>	<b>Tot n. (%)</b>	<b>&lt;10.0 n. (%)</b>	<b>≥10.0 n. (%)</b>	<b>Tot n. (%)</b>
<b>&lt;10.0</b>	65 (21.6)	0 (0.0)	65 (16.4)	12 (11.5)	0 (0.0)	12 (3.6)
<b>≥10.0</b>	236 (78.4) <sup>°</sup>	95 (100.0)	331 (83.6)*	92 (88.5) <sup>°</sup>	232 (100.0)	324 (96.4)*
<b>Totale</b>	301 (100.0)	95 (100.0)	396 (100.0)	104 (100.0)	232 (100.0)	336 (100.0)

\* IC95%: 79.6-87.1 Hexavac vs 93.8-98.1 Infanrix Hexa

<sup>°</sup> IC95%: 73.6-83.2 Hexavac vs 80.7-93.9 Infanrix Hexa

Tabella 20: Concentrazione anti-HBs post-booster per la popolazione inclusa nello studio.

Anche le GMC ed il GMCR delle concentrazioni di anti-HBs pre- e post-challenge in entrambi i sottogruppi delle due coorti in studio hanno mostrato valori più elevati nella coorte Infanrix Hexa rispetto alla coorte Hexavac. I risultati in dettaglio sono presentati in Tabella 21.

Concentrazione anti-HBs pre-challenge	Coorte Hexavac			Coorte Infanrix Hexa		
	<10.0 UI/l (N=301)	≥10.0 UI/l (N=95)	Tot (N=396)	<10.0 UI/l (N=104)	≥10.0 UI/l (N=232)	Tot (N=336)
<b>PRE-CHALLENGE</b>						
GMC (UI/l)	5.0	29.8	7.7	5.0	56.8	26.8
[IC95%]	ND	[25.2-35.2]	[7.0-8.3]	ND	[49.0-65.9]	[22.9-31.4]
Mediana	5.0	26.3	5.0	5.0	51.4	23.4
Range	5.0-5.0	10.2-344.5	5.0-344.5	5.0-5.0	10.0-1943.0	5.0-1943.0
<b>POST-CHALLENGE</b>						
GMC (UI/l)	91.1	2113.4	191.9	221.6	4691.6	1823.8
[IC95%]	[72.5-114.5]	[1608.2-2777.5]	[152.8-241.0]	[148.7-330.3]	[3927.4-5604.4]	[1449.0-2295.5]
Mediana	128.7	2537.0	268.6	267.2	4512.0	2669.0
Range	5.0-32460.0	47.9-4046.0	5.0-40460.0	5.0-12730.0	64.6-176600.0	5.0-176600.0
<b>GMCR post-/pre-challenge</b>						
GMC (UI/l)	18.2	70.9	25.2	44.3	82.6	68.1
[IC95%]	[14.5-22.9]	[54.3-92.6]	[20.8-30.6]	[29.7-66.1]	[70.5-96.7]	[57.6-80.5]
Mediana	25.7	84.6	36.0	53.4	87.0	78.6
Range	1.0-6492.0	1.8-664.8	1.0-6492.0	1.0-2546.0	1.8-1162.8	1.0-2546.0

Tabella 21: GMC e GMCR pre- e post-challenge nella popolazione inclusa nello studio.

## Profilo di sicurezza del vaccino HBVAXPRO

Per valutare il profilo di sicurezza del vaccino ricombinante monovalente anti-epatite B (HBVAXPRO 5µg/0.5ml) impiegato come challenge, è stata presa in considerazione la popolazione “arruolata” nello studio (N=751), costituita da individui che hanno partecipato alla prima visita prevista dal protocollo ricevendo una dose (HBsAg 5µg/0.5ml) del vaccino HBVAXPRO.

Un soggetto, appartenente alla coorte Infanrix Hexa, è stato escluso dall’analisi in quanto perso al follow-up e quindi la scheda-diario necessaria per effettuare la valutazione del profilo di sicurezza del vaccino HBVAXPRO non è mai pervenuta alla ASL di arruolamento. La popolazione analizzata è risultata perciò pari a 750 soggetti, 409 della coorte Hexavac e 341 della coorte Infanrix Hexa.

Complessivamente, il 46.1% (346/750) dei soggetti arruolati ha riportato almeno una reazione avversa a livello del sito di inoculo del vaccino (sollecitata o non sollecitata) oppure un evento avverso sistemico nei 14 giorni successivi all'inoculazione di HBVAXPRO (Tabella 22). Il 41.3% (310/750) ha presentato un evento avverso vaccino-correlato.

<b>Popolazione "arruolata" nello studio per la valutazione del profilo di sicurezza di HBVAXPRO (N=750)</b>			
<b>Evento avverso</b> (0-14 giorni post-HBVAXPRO)	<b>Coorte Hexavac</b> n. (%)	<b>Coorte Infanrix Hexa</b> n. (%)	<b>Totale</b> n. (%)
<i>Si</i>	181 (44.3)	165 (48.4)	346 (46.1)
<i>No</i>	228 (55.7)	176 (51.6)	404 (53.9)
<i>Tot</i>	409 (100.0)	341 (100.0)	750 (100.0)

Tabella 22: Presenza/assenza di eventi avversi nei 14 giorni successivi alla somministrazione di HBVAXPRO.

Il 40.7% (305/750) degli arruolati ha manifestato almeno un evento avverso a livello del sito di iniezione del vaccino nel periodo 0-14 giorni dalla somministrazione di HBVAXPRO.

La maggior parte delle reazioni avverse al sito di iniezione erano sollecitate ed insorte nei primi 4 giorni post-iniezione. Si è trattato per la maggior parte di dolore (39.3% o 295/750) ed in percentuale inferiore di gonfiore ed eritema (rispettivamente 3.5% o 26/750 e 2.4% o 18/750).

Due soggetti (0.3%) hanno invece riferito reazioni avverse non sollecitate a livello del sito di iniezione entro i 14 giorni dalla somministrazione di HBVAXPRO: un soggetto ha presentato ecchimosi e l'altro gonfiore (Tabella 23).

La maggior parte degli eventi avversi a livello del sito di iniezione era di lieve intensità; solo lo 0.7% (5/750) dei soggetti ha manifestato una reazione avversa di grave intensità. Tutti gli eventi avversi nel sito di iniezione sono stati considerati vaccino-correlati.

<b>Evento avverso nel sito di iniezione</b> (0-14 giorni post-HBVAXPRO)	<b>Coorte Hexavac</b> (N=409) n. (%)	<b>Coorte Infanrix Hexa</b> (N=341) n. (%)	<b>Totale</b> (N=750) n. (%)
<b>Reazione avversa sollecitata</b> (0-4 giorni post-iniezione)	159 (38.9)	145 (42.5)	304 (40.5)
eritema	7 (1.7)	11 (3.2)	18 (2.4)
gonfiore	6 (1.5)	20 (5.9)	26 (3.5)
dolore	156 (38.1)	139 (40.8)	295 (39.3)
<b>Reazione avversa non sollecitata</b> (0-14 giorni post-iniezione)	1 (0.2)	1 (0.3)	2 (0.3)
<b>Totale *</b>	159 (38.9)	146 (42.8)	305 (40.7)

\* un soggetto può manifestare più di un evento avverso

Tabella 23: Reazioni avverse nel sito di iniezione del vaccino HBVAXPRO.

L'11.7% (88/750) degli arruolati ha riportato almeno un evento avverso sistemico nei 14 giorni successivi la somministrazione di HBVAXPRO. In particolare, nei 4 giorni post-iniezione lo 0.8% dei soggetti (6/750) ha manifestato piressia (temperatura corporea  $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ ), mentre l'11.6% (87/750) ha presentato altri eventi avversi sistemici di varia natura entro i 14 giorni dalla somministrazione del vaccino (emicrania 3.6%, dolore oro-faringeo 1.6%, naso-faringite 0.9% e vomito 0.7%) (Tabella 24).

Gli eventi avversi sistemici vaccino-correlati nel periodo 0-14 giorni post-iniezione di HBVAXPRO sono risultati complessivamente pari all'1.9%. Tre eventi avversi sistemici sono insorti oltre 14 giorni dalla somministrazione di HBVAXPRO, nessuno dei quali è risultato vaccino-correlato.

<b>Evento avverso sistemico</b> (0-14 giorni post-HBVAXPRO)	<b>Coorte Hexavac</b> (N=409) n. (%)	<b>Coorte Infanrix Hexa</b> (N=341) n. (%)	<b>Totale</b> (N=750) n. (%)
<b>Piressia (<math>T</math> corporea <math>\geq 38^{\circ}\text{C}</math>)</b> (0-4 giorni post-iniezione)	1 (0.2)	5 (1.5)	6 (0.8)
<b>Altri eventi avversi sistemici</b> (0-14 giorni post-iniezione)	43 (10.5)	44 (12.9)	87 (11.6)
<b>Totale *</b>	43 (10.5)	45 (13.2)	88 (11.7)

\* un soggetto può manifestare più di un evento avverso

Tabella 24: Eventi avversi sistemici a seguito di somministrazione di una dose di HBVAXPRO.

Tra la prima e la seconda visita prevista dal protocollo dello studio sono stati riportati due (0.3%) eventi avversi gravi: un soggetto ha riportato uno Schwannoma o neurinoma alla coscia sinistra, mentre l'altro individuo ha manifestato una sclerosi multipla. Nessuno di questi eventi avversi severi è stato causalmente correlato alla somministrazione di HBVAXPRO 5 $\mu\text{g}$ /0.5ml dal responsabile del centro di arruolamento.

Per tutta la durata del trial clinico, non sono stati registrati decessi e per nessun soggetto si è resa necessaria l'esclusione dallo studio per insorgenza di eventi avversi.

# *STUDIO 3:*

*Valutazione epidemiologica delle epatiti acute  
da HBV in Italia dopo l'introduzione della  
vaccinazione universale anti-epatite B*

## **STUDIO 3: Valutazione epidemiologica delle epatiti acute da HBV in Italia dopo l'introduzione della vaccinazione universale anti-epatite B**

### **PREMESSA**

La vaccinazione è la misura più efficace ed economicamente più vantaggiosa su scala mondiale per il controllo e la prevenzione dell'epatite virale di tipo B e delle gravi sequele epatiche croniche ad essa correlate<sup>287-290,309,310,348</sup>.

L'Italia è stato uno dei primi Paesi al mondo ad aver intrapreso una politica vaccinale nazionale anti-HBV: iniziata nel 1983 su base regionale per i soli gruppi a rischio di contrarre l'infezione, la vaccinazione è diventata universale ed obbligatoria nel 1991 per tutti i nuovi nati e, fino al 2003, per i dodicenni<sup>328,329</sup>.

Grazie all'efficienza del sistema di vaccinazione italiano ed all'interesse pubblico nei confronti della malattia, nel giro di pochi anni è stata raggiunta una copertura vaccinale >95%, soglia raccomandata dal WHO per la cosiddetta immunità di gregge (quota minima di soggetti immunizzati affinché siano indirettamente protetti anche coloro che non sono vaccinati). Nonostante i grandi successi iniziali, dal 2013 si sta registrando un cambiamento di tendenza, ovvero un progressivo calo a livello nazionale della copertura vaccinale pediatrica anti-epatite B (3 dosi di vaccino). Mentre nel 2012 il tasso nazionale risultava pari al 96.1%, nel triennio successivo le percentuali sono progressivamente scese al 95.5% nel 2013, 94.6% nel 2014 ed infine 93.2% nel 2015. I dati ad oggi disponibili sulla copertura vaccinale nazionale per regione sottolineano che nel 2015 solo Sardegna, Lazio, Calabria, Abruzzo e Basilicata hanno mantenuto un livello di immunizzazione pediatrico  $\geq 95.0\%$  (rispettivamente 95.0%, 95.2%, 95.3%, 95.7% e 97.8%)<sup>349</sup>. Per mantenere un tasso di copertura vaccinale nazionale tale da garantire l'immunità di gregge e quindi un'effettiva protezione a livello sociale, a tutti i genitori o tutori legali è richiesta la vaccinazione dei loro bambini. Gli oppositori alla vaccinazione sono invitati a discutere le loro obiezioni con personale sanitario esperto e qualificato (pediatri, infermieri, operatori nella sanità pubblica, etc.) al fine di renderli consapevoli dell'importanza degli effetti della vaccinazione sia sul singolo individuo sia sull'intera comunità. Gli oppositori, che nonostante ripetuti inviti a

partecipare al programma d'immunizzazione universale si astengono alla vaccinazione dei minori a loro carico, sono obbligati a firmare il loro rifiuto.

Tuttavia, come conseguenza della politica vaccinale italiana anti-HBV, circa 20 milioni di persone sono attualmente immunizzate contro l'infezione virale con straordinari risultati in termini di efficacia e sicurezza. La vaccinazione anti-HBV ha ridotto l'incidenza dell'infezione, il tasso di portatori cronici, la morbosità e la mortalità delle manifestazioni epatiche HBV-correlate<sup>204,331-336</sup>.

Nonostante questi successi, dall'introduzione della vaccinazione universale anti-HBV alcuni casi di epatite virale di tipo B sono stati notificati al sistema di sorveglianza nazionale delle epatiti virali acute (SEIEVA – Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta) coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), sia tra soggetti vaccinati sia tra soggetti non vaccinati ma a maggior rischio di contrarre l'infezione o addirittura sfuggiti alla vaccinazione seppur appartenenti alla coorte dell'obbligo vaccinale.

A questo proposito, in collaborazione con l'ISS, è stato condotto uno studio per valutare l'epidemiologia delle infezioni da HBV in Italia nel periodo successivo l'introduzione dell'immunizzazione universale obbligatoria ed indagare i motivi di un eventuale fallimento vaccinale.

## **OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Questo studio si articola in 3 obiettivi:

- stimare la proporzione di individui opportunamente vaccinati tra i casi di epatite B acuta in Italia nel periodo successivo l'introduzione della vaccinazione di massa anti-HBV;
- determinare la proporzione di casi di epatite B che si sarebbero potuti evitare se fosse stata rispettata, in termini di dosi e di tempi, la scheda vaccinale prevista in Italia per l'immunizzazione anti-epatite B;
- valutare le ragioni del fallimento vaccinale nel periodo post-immunizzazione universale anti-HBV sul territorio italiano.



## **DISEGNO DELLO STUDIO**

È stato condotto uno studio descrittivo retrospettivo sui casi di epatite virale acuta di tipo B notificati in Italia al SEIEVA nel periodo compreso tra il 1993 ed il 2014.

A questo studio hanno partecipato tutti i membri della rete di sorveglianza SEIEVA, l'Istituto Superiore di Sanità, che coordina il SEIEVA, ed il Laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute dell'Università degli Studi di Milano, per l'esecuzione dei test virologici molecolari.

Secondo il sistema di sorveglianza SEIEVA, la definizione di caso confermato di epatite virale acuta di tipo B è basata su criteri sierologici, ovvero positività per anticorpi anti-HBc di classe IgM, ai quali si possono aggiungere evidenze cliniche che includono sintomatologia riconducibile ad un epatite acuta ed incremento (più di 10 volte) dei valori sierici di alanina amino transferasi (ALT)<sup>204</sup>.

I casi confermati di epatite virale acuta di tipo B sono stati indagati per verificarne lo stato vaccinale del soggetto infetto. Sono stati reclutati per questo studio solo i casi con informazioni univoche e documentate in merito allo stato vaccinale anti-HBV, al fine di suddividere la popolazione arruolata in casi vaccinati e casi non vaccinati.

I casi vaccinati sono stati analizzati per verificare se la schedula vaccinale anti-HBV era completa e corretta. Per questo studio è stato definito come "caso opportunamente vaccinato" un soggetto con diagnosi di epatite B acuta, precedentemente immunizzato contro HBV secondo i tempi e le dosi previste dalla schedula vaccinale nazionale anti-epatite B (3 dosi di vaccino anti-HBV somministrate a 3, 5 e 11 mesi di vita per i neonati ed ai tempi 0, 1, 6 mesi per bambini, adolescenti ed adulti) e con sintomatologia di epatite acuta insorta almeno 6 mesi dopo il completamento del ciclo vaccinale primario (tempo di incubazione massimo per l'infezione da HBV). Non è stata invece presa in considerazione la risposta anticorpale post-immunizzazione (anticorpi anti-HBs  $\geq 10$  UI/l dopo 1-3 mesi dall'ultima dose di vaccino del ciclo di immunizzazione primario), poiché in Italia non è prevista per legge l'esecuzione di test di routine per valutare il titolo anticorpale a seguito di vaccinazione. Tutti i casi con deviazioni rispetto a quanto raccomandato per legge nella schedula vaccinale anti-epatite B per l'immunizzazione primaria (definiti come "casi non opportunamente vaccinati"), sono stati esclusi dalle successive analisi dei risultati.

Tra i casi opportunamente vaccinati, qualora possibile, è stato testato un campione di siero per rilevare la presenza del genoma virale. Per i soggetti risultati positivi ad HBV-DNA è stata indagata l'eventuale presenza di ceppi virali mutanti come causa d'infezione.

I casi non vaccinati sono stati invece analizzati per verificarne l'eventuale appartenenza a gruppi a maggior rischio di contrarre l'infezione oppure alla coorte dell'obbligo vaccinale e pertanto sfuggiti all'immunizzazione universale anti-epatite B. Ai soggetti con epatite acuta B e conviventi di portatori cronici di HBsAg, consci dello stato di infezione cronica dei propri familiari, è stato proposto un questionario per raccogliere informazioni in merito ai motivi della mancata vaccinazione.

Tutti i dati analizzati sono stati raccolti dopo aver proceduto all'anonimizzazione, in accordo con la legislazione italiana sulla privacy.

La popolazione ed il disegno dello studio sono riassunti in Figura 46.

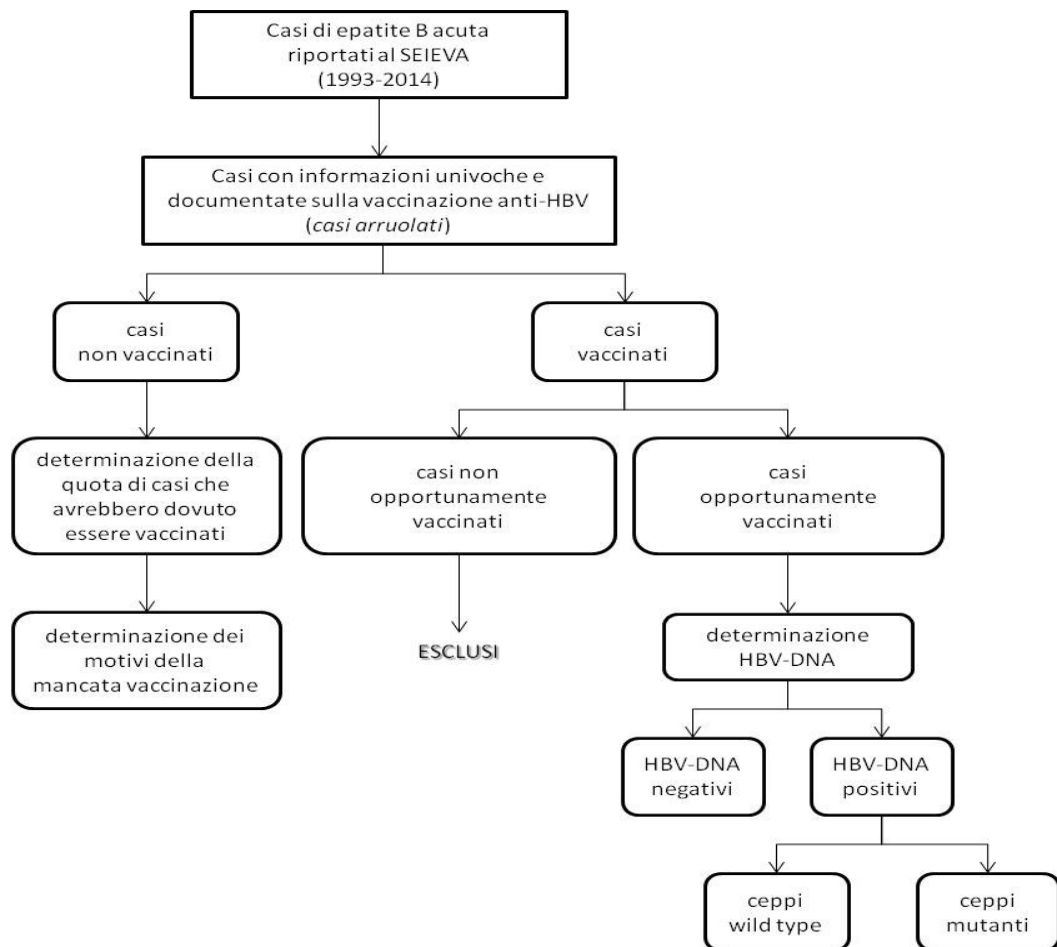


Figura 46: Popolazione e Disegno dello studio.

## **MATERIALI E METODI**

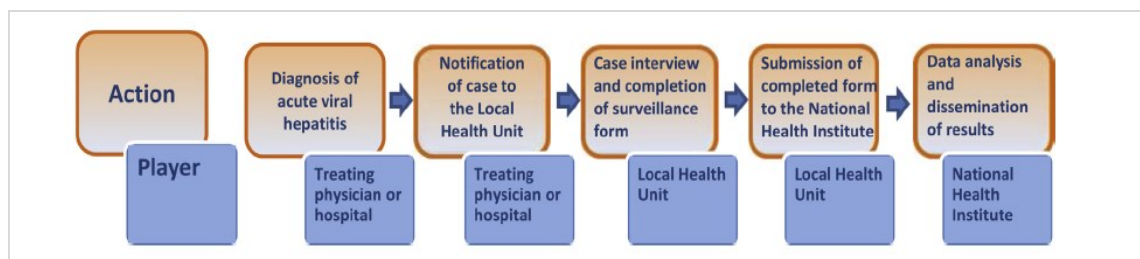
### **Sistema di Sorveglianza SEIEVA**

Il Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta o SEIEVA, è un sistema di sorveglianza nazionale speciale-passivo, coordinato dal Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), che affianca ed integra il sistema di sorveglianza nazionale ufficiale, il Sistema di Notifica Obbligatoria delle Malattie Infettive, gestito dal Ministero della Salute italiano.

Il SEIEVA è stato implementato in Italia nel 1984 per migliorare ed approfondire la conoscenza degli aspetti epidemiologici dei diversi tipi di epatite virale acuta a livello nazionale e collezionare maggiori informazioni relative ai fattori di rischio connessi a tali infezioni<sup>350</sup>. Attraverso l'integrazione di questionari epidemiologici con i risultati di laboratorio, i dati SEIEVA costituiscono un importante database nazionale che consente un monitoraggio dell'andamento e della diffusione di ciascuna epatite, la caratterizzazione dei patogeni che la causano, nonché la comprensione e la stima del contributo relativo dei diversi fattori di rischio associati. Ciò permette di fatto la definizione di misure preventive alle quali dare priorità ed il monitoraggio degli effetti dei diversi programmi di prevenzione. Nel monitoraggio condotto dal SEIEVA sono dunque incluse le infezioni causate da HBV e, di conseguenza, il controllo dell'efficienza della politica vaccinale anti-epatite B che coinvolge tutto il territorio italiano.

Il sistema consiste in una rete di 151 ASL (Aziende Sanitarie Locali) dislocate su tutto il territorio nazionale che, coordinate dall'ISS, aderiscono alla sorveglianza su base volontaria e che coprono circa il 78% della popolazione italiana (approssimativamente 46 milioni di persone).

Il flusso di lavoro ed i membri coinvolti nel sistema di sorveglianza SEIEVA sono riassunti in Figura 47.



*Figura 47: Flusso di lavoro e membri del sistema di sorveglianza SEIEVA.*

I casi clinici di epatite virale acuta sono notificati alla ASL di pertinenza dai medici (ospedalieri o di base) che effettuano la diagnosi, mediante il sistema di notifica obbligatorio delle malattie infettive. Il personale sanitario delle ASL che aderiscono alla rete SEIEVA, in seguito alla segnalazione del caso e già prima che sia noto il tipo di epatite virale, provvede ad un'intervista (faccia a faccia o telefonica) del soggetto infetto mediante l'impiego di un apposito questionario epidemiologico (Figura 48), che permette di raccogliere informazioni sulle caratteristiche socio-demografiche, sui fattori di rischio precedenti l'infezione e sul decorso clinico della patologia. Il questionario è identico per tutti i tipi di epatite virale; tuttavia, poiché i fattori di rischio ed il periodo di possibile esposizione al patogeno sono differenti, tali informazioni sono raccolte in sezioni separate in base al diverso tipo di epatite virale.

Completata l'intervista, l'operatore sanitario provvede a contattare l'ospedale o il medico curante (nel caso di pazienti non ospedalizzati) per ottenere informazioni sulla conferma diagnostica e gli esiti dei test di laboratorio per la ricerca dei marcatori virali. Tali informazioni vengono registrate in un'apposita sezione del questionario epidemiologico.

Tutti i questionari compilati confluiscono nel database SEIEVA mediante sito web dedicato oppure, qualora questa modalità di invio non fosse possibile, in formato cartaceo mediante posta ordinaria o fax<sup>351</sup>.

L'analisi dei dati viene effettuata annualmente ed i risultati vengono presentati e diffusi a tutti i partecipanti della rete SEIEVA ed alla comunità scientifica attraverso rapporti tecnici, articoli scientifici, presentazioni a convegni nazionali ed internazionali ed attraverso l'apposito sito internet ([www.iss.it/seieva/](http://www.iss.it/seieva/))<sup>204</sup>.



**QUESTIONARIO DI UN CASO NOTIFICATO  
DI EPATITE VIRALE ACUTA (SEIEVA)**

A.S.L. _____ Regione _____ Numero Caso  _ _ _ _ _ _ _ _	
	<b>STRETTAMENTE RISERVATO</b> Si prega di dare uguale rilievo a tutte le domande e segnare o scrivere la risposta nelle apposite caselle o righe. Se il caso è di età inferiore a 15 anni, intervistare insieme ad un parente o tutore.
Data Intervista giorno  _ _  mese  _ _  anno  _ _  Cognome iniziale  _  Nome iniziale  _	
Comune di domicilio abituale _____	
Cittadinanza _____ Se è diversa da "Italiana", da quanti anni vive in Italia? anni  _ _	
Età  _ _  Sesso <input checked="" type="checkbox"/> Maschio <input checked="" type="checkbox"/> Femmina Attività _____	
Titolo di studio più alto conseguito (del capofamiglia, se il caso è minorenne) _____	
	<b>IMPORTANTE</b> EFFETTUARE L'INTERVISTA IN UN CLIMA DI ASSOLUTA RISERVATEZZA. Intervistare il paziente senza aspettare i risultati di laboratorio da aggiungere appena disponibili
1	Durante la sua malattia è diventato giallo? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
2	In che data è iniziata la malattia? giorno  _ _  mese  _ _  anno  _ _
3	E stato ospedalizzato per questa malattia? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
3.a	Se Sì, quanti giorni è rimasto in ospedale? giorni  _ _
<b>DURANTE LE 6 SETTIMANE PRIMA DELL'INIZIO DELLA MALATTIA:</b>	
4	Ha preso farmaci? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
4.a	Se Sì, quali _____ Per quanto tempo? giorni  _ _
4.b	Se Sì, quali _____ Per quanto tempo? giorni  _ _
4.c	Se Sì, quali _____ Per quanto tempo? giorni  _ _
4.d	Se Sì, quali _____ Per quanto tempo? giorni  _ _
5	Ha consumato frutti di mare? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
5.a	Se Sì, i frutti di mare consumati erano tutti o in parte crudi? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
6	Ha consumato frutti di bosco? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
6.a	Se Sì, i frutti di bosco erano: <input checked="" type="checkbox"/> Congelati <input checked="" type="checkbox"/> Freschi <input checked="" type="checkbox"/> Entrambi <input checked="" type="checkbox"/> Non so
7	Ha bevuto acqua di pozzo o di sorgente? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
8	Ha trascorso almeno una o più notti fuori dalla sua città? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
8.a	Se Sì, dove? _____ Quando giorno  _ _  mese  _ _  anno  _ _
9	Le è stata somministrata almeno una dose di vaccino per l'epatite A? <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Sì, una dose <input checked="" type="checkbox"/> Sì, due dosi <input checked="" type="checkbox"/> Non so
9.a	Se Sì: 1° dose - tipo vaccino _____ data giorno  _ _  mese  _ _  anno  _ _
9.b	2° dose - tipo vaccino _____ data giorno  _ _  mese  _ _  anno  _ _
<b>DURANTE I 6 MESI PRIMA DELL'INIZIO DELLA MALATTIA:</b>	
10	Ha avuto somministrazione di sangue o di plasma? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
11	Ha avuto somministrazione di altri derivati del sangue (fattori della coagulazione, immunoglobuline, etc.)? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
12	Ha avuto interventi chirurgici (compresa piccola chirurgia)? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
12.a	Se Sì: Specificare il tipo di intervento: _____ <input checked="" type="checkbox"/> Ambulatoriale <input checked="" type="checkbox"/> Con ricovero
13	E' stato sottoposto ad endoscopia? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
13.a	Se Sì: Specificare il tipo di endoscopia: _____ <input checked="" type="checkbox"/> Ambulatoriale <input checked="" type="checkbox"/> Con ricovero
14	E' stato ospedalizzato (incluso Day Hospital)? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
14.a	Se Sì: Ospedale _____ Reparto _____ Quando giorno  _ _  mese  _ _  anno  _ _
14.b	Ospedale _____ Reparto _____ Quando giorno  _ _  mese  _ _  anno  _ _
14.c	Ospedale _____ Reparto _____ Quando giorno  _ _  mese  _ _  anno  _ _
15	Ha fatto uso di droghe? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
15.a	Se Sì, modalità di assunzione <input checked="" type="checkbox"/> endovenosa <input checked="" type="checkbox"/> inalazione <input checked="" type="checkbox"/> entrambe <input checked="" type="checkbox"/> altro <input checked="" type="checkbox"/> Non so
15.b	Se Sì, ha mai avuto contatti con un SERT? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
16	Ha avuto un trattamento dentario? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
17	Si è fatto i buchi alle orecchie o altro tipo di piercing? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
18	Si è fatto un tatuaggio? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
19	Le è stata praticata l'ago puntura? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
20	Si è rasato dal barbiere? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so
21	E' stato dal callista o dal manicure? <input checked="" type="checkbox"/> Sì <input checked="" type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Non so



**QUESTIONARIO DI UN CASO NOTIFICATO  
DI EPATITE VIRALE ACUTA (SEIEVA)**

22	E' stato emodializzato?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
23	Le è stata somministrata almeno una dose di <b>vaccino per l'epatite B?</b>	<input type="checkbox"/> 1 Si, una dose	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
		<input type="checkbox"/> 2 Si, due dosi		
		<input type="checkbox"/> 3 Si, tre dosi		
23.a	Se Sì: 1° dose - tipo vaccino _____ data	giorno  __   __	mese  __   __	anno  __   __
23.b	2° dose - tipo vaccino _____ data	giorno  __   __	mese  __   __	anno  __   __
23.c	3° dose - tipo vaccino _____ data	giorno  __   __	mese  __   __	anno  __   __
24	Durante i <b>6 mesi prima</b> dell'inizio della sua epatite un suo familiare, convivente, amico, compagno di scuola o di lavoro ha avuto l'epatite?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
24.a	Se Sì, la loro malattia è iniziata meno di due mesi prima della sua?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
25	Ha un convivente o partner sessuale HBsAg (Antigene Australia) positivo?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
25.a	Se Sì: Tipo di relazione _____			
25.b	Era a conoscenza che un componente della sua famiglia (o il suo partner) era portatore di HBsAg prima che Lei avesse l'epatite acuta?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
25.c	Se Sì, perché non si era vaccinato?	<input type="checkbox"/> 1 Non ero sicuro dell'efficacia	<input type="checkbox"/> 2 Paura degli effetti collaterali	<input type="checkbox"/> 3 Non sapeva a quale struttura rivolgersi
		<input type="checkbox"/> 4 Altro _____		
26	Ha un convivente o partner sessuale anti-HCV positivo?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
27	Ha un convivente tossicodipendente?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
28	Durante i <b>6 mesi prima</b> dell'inizio della sua malattia ha avuto partner sessuali?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 7 Preferisco non rispondere
28.a	Se Sì, con quanti partner ha avuto rapporti sessuali?	N. Partner <i>maschili</i>  __   __  <i>femminili</i>  __   __		
29	Ha avuto un partner sessuale tossicodipendente negli <b>ultimi 6 mesi?</b>	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
30	Durante i <b>6 mesi prima</b> dell'inizio della sua malattia ha avuto rapporti occasionali?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
30.a	Se Sì, ha utilizzato il profilattico	<input type="checkbox"/> 1 Sempre	<input type="checkbox"/> 2 Occasionalmente	<input type="checkbox"/> 3 Mai
31	Quante persone vivono nella sua casa, Lei incluso?	N. Persone  __   __		
32	Vi sono bambini che frequentano un asilo nido o una scuola materna?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
33	E' donatore periodico di sangue?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
34	In passato ha eseguito un test per l'HIV?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 7 Preferisco non rispondere
34.a	Se Sì, è risultato positivo al test per l'HIV?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
<b>VALORI MASSIMI DEI SEGUENTI PARAMETRI DI LABORATORIO</b>				
35	AST  __   __   __   __  ALT  __   __   __   __  Bilirubina Totale  __   __   __  Bilirubina Diretta  __   __   __  INR  __   __   __			
36	<b>RISULTATI DI LABORATORIO</b> Data del prelievo di sangue	giorno  __   __	mese  __   __	anno  __   __
37	E' positivo per HBsAg?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non ricercato
38	E' positivo per IgM anti-HBc?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non ricercato
39	E' positivo per IgM anti-Epatite A?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non ricercato
40	E' positivo per anti-Delta?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non ricercato
41	E' positivo per anti-HCV?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non ricercato
42	E' positivo per HCV-RNA?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non ricercato
42.a	Se Sì, livello viremia	__   __   __   __		
43	E' positivo per IgM anti-Epatite E?	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non ricercato
44	<b>DECORSO CLINICO</b> Encefalopatia	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
45	Fulminante	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
46	Trapianto di fegato	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
47	Decesso	<input type="checkbox"/> 1 Si	<input type="checkbox"/> 0 No	<input type="checkbox"/> 8 Non so
47.a	In caso di decesso indicare la data	giorno  __   __	mese  __   __	anno  __   __
		Causa iniziale: _____		
48	Commenti: _____			
	Firma dell'intervistatore _____			

Figura 48: Questionario epidemiologico SEIEVA.

Per questo studio sono stati presi in considerazione solo i casi di epatite virale acuta di tipo B notificati al SEIEVA nel periodo 1993-2014. Mediante l'impiego dei questionari epidemiologici del SEIEVA, di tali casi sono state raccolte ed analizzate le informazioni socio-demografiche, cliniche ed epidemiologiche. Inoltre sono stati presi in considerazione ed esaminati i risultati di laboratorio inerenti i marcatori sierologici di HBV, le informazioni relative ai fattori di rischio nei sei mesi precedenti la diagnosi di epatite B acuta e tutti i dati riguardanti lo stato vaccinale del soggetto infetto. Le informazioni relative la schedula vaccinale anti-epatite B (dosi, tempi e tipologia di vaccino anti-HBV somministrato) sono state confermate dagli operatori sanitari della rete SEIEVA revisionando i registri vaccinali delle ASL.

## **Test virologici**

I risultati di laboratorio per la diagnosi di infezione acuta da HBV mediante la ricerca sierologica dei marcatori virali (HBsAg ed anti-HBc IgM) sono stati recuperati dal questionario epidemiologico SEIEVA.

I test virologici per la caratterizzazione molecolare dei ceppi virali causa di epatite B sono stati eseguiti dal Laboratorio di Virologia del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute dell'Università degli Studi di Milano. La caratterizzazione molecolare, quando possibile, è stata condotta per le infezioni da HBV insorte in soggetti opportunamente vaccinati; non sono stati presi in considerazione i casi con deviazioni nella schedula vaccinale rispetto a quanto raccomandato per legge per l'immunizzazione primaria anti-epatite B.

In breve, il campione di siero del caso di epatite virale acuta di tipo B pervenuto al laboratorio è stato estratto mediante kit di estrazione commerciale ed amplificato attraverso l'impiego di nested-PCR in house. I campioni risultati HBV-DNA positivi sono stati sequenziati ed è stata condotta un'analisi filogenetica per la determinazione del genotipo virale. E' stata inoltre indagata la possibile presenza di mutazioni amminoacidiche nella regione MHR ed in particolare a livello del determinante  $a$  di HBsAg per individuare l'eventuale presenza di ceppi mutanti come causa di infezione in soggetti opportunamente vaccinati.

## **Estrazione di HBV-DNA**

L'estrazione del DNA di HBV è stata eseguita con l'impiego del kit commerciale QIAamp MinElute Virus Spin (Qiagen GmbH, Germany), seguendo le indicazioni riportate dalla ditta produttrice che prevedono 4 fasi di lavoro (lisi, adsorbimento, lavaggi ed eluizione) e l'impiego di apposite colonnine contenenti una membrana di fibre di vetro (silice) ad elevata affinità per gli acidi nucleici (DNA e RNA >200 bp). Al termine del processo di estrazione, il DNA viene purificato dalle proteine e da altri

eventuali contaminanti presenti nel campione che potrebbero inibire successive reazioni enzimatiche e di amplificazione (Figura 49).

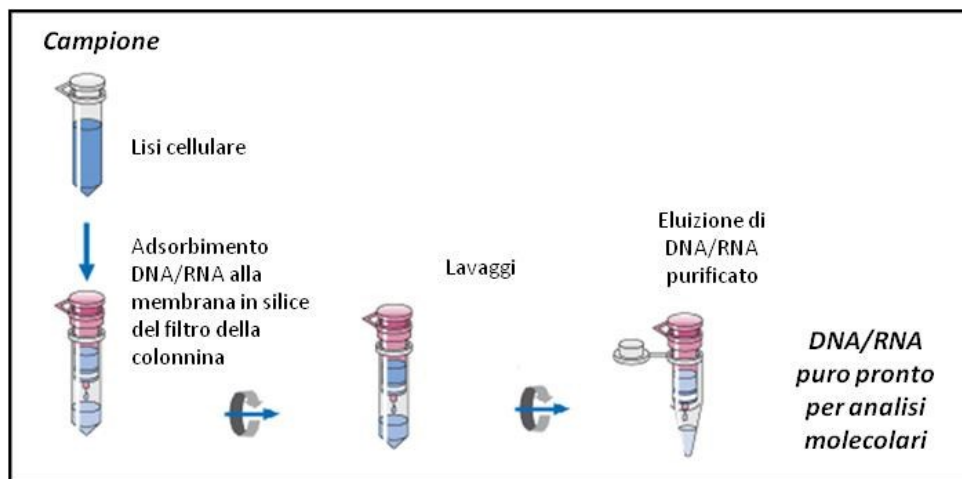


Figura 49: Estrazione di acidi nucleici mediante kit commerciale QIAamp MinElute Virus Spin (QIAGEN).

In breve, 200  $\mu$ l di campione di siero sono stati addizionati a 25  $\mu$ l di proteasi (QIAGEN Protease) e 200  $\mu$ l di buffer di lisi (Buffer AL, contenente 28  $\mu$ g/ml di carrier RNA); tale miscela è stata resa omogenea ed incubata a 56°C per 15 minuti al fine di favorire la lisi cellulare. La temperatura elevata e l'aggiunta di proteasi e buffer AL permettono di avere condizioni denaturanti garantendo contemporaneamente l'inattivazione delle nucleasi presenti nel campione, preservando quindi le molecole di DNA e RNA.

Il lisato, a seguito di aggiunta di etanolo, è stato trasferito in apposite colonnine con filtro in silice (QIAamp MinElute Columns) e sottoposto a centrifugazione per permettere l'adsorbimento degli acidi nucleici alla membrana della colonnina. L'impiego di etanolo favorisce la precipitazione di DNA ed il legame alla membrana in silice, mentre il resto del lisato viene eliminato passando attraverso i pori del filtro.

Le colonnine con legato l'acido nucleico sono state sottoposte a 3 lavaggi consecutivi con appositi buffer di lavaggio (Buffer AW1 ed AW2) per eliminare i contaminanti, seguiti ciascuno da centrifugazione. Il pH e la concentrazione di sali dei buffer di lavaggio permettono infatti di impedire ai contaminanti di rimanere legati alla membrana delle colonnine e quindi aumentare la purezza del DNA.

Infine, gli acidi nucleici puri sono stati fatti eluire in 50  $\mu$ l di acqua per biologia molecolare (RNAsi e DNAsi free) e raccolti in apposite provette da 1.5 ml. Il DNA estratto è stato impiegato immediatamente per l'esecuzione dei test molecolari e poi conservato a -20°C.

Ogni seduta di estrazione ha previsto almeno un controllo negativo (acqua per biologia molecolare), per escludere eventuali cross-contaminazioni, ed un controllo positivo (campione di siero di paziente



di cui era noto lo stato di positività per HBV-DNA), per verificare che il processo di estrazione fosse avvenuto con successo.

### Amplificazione del DNA virale mediante nested-PCR (in house)

Il materiale genetico estratto è stato utilizzato come template per l'amplificazione di HBV-DNA mediante nested-PCR (n-PCR) in house. Si tratta di una doppia amplificazione (step I e step II) che avviene sequenzialmente su due porzioni nucleotidiche, una interna all'altra, e che richiede due coppie di primers per ogni sequenza riprodotta al fine di aumentare la sensibilità e la specificità della reazione e rilevare con precisione il target desiderato.

Per questo studio sono state amplificate due regioni dell'ORF pre-S/S di HBV, parzialmente sovrapposte l'una all'altra e contenenti entrambe la porzione nucleotidica corrispondente alla regione MHR di HBsAg<sup>352,353</sup>. Dall'amplificazione di queste due regioni sono stati ottenuti due segmenti nucleotidici di lunghezza rispettivamente pari a 466 bp e 485 bp. La sequenza nucleotidica di ciascun primer è illustrata in Tabella 25.

ORF pre-S/S di HBV-DNA - Set A [352]			
step I	<i>sense</i>	5' - CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC - 3'	771 bp
	<i>anti-sense</i>	5' - TACCCAAAGACAAAAGAAAATTGG - 3'	
step II	<i>sense</i>	5' - GTTGACAARAATCCTCACAATAC - 3'	466 bp
	<i>anti-sense</i>	5' - TAGTAACTGAGCCARGAGAAAC - 3'	
ORF pre-S/S di HBV-DNA - Set B [353]			
step I	<i>sense</i>	5' - YCCTGCTGGTGGCTCCAGTTC - 3'	676 bp
	<i>anti-sense</i>	5' - AAGCCANACARTGGGGGAAAGC - 3'	
step II	<i>sense</i>	5' - GTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTC - 3'	485 bp
	<i>anti-sense</i>	5' - AAGCCANACARTGGGGGAAAGC - 3'	

Tabella 25: Primers per n-PCR per l'amplificazione di due regioni dell'ORF pre-S/S di HBV-DNA.

Per ogni campione è stata preparata una miscela di reazione di 45 µl alla quale sono stati addizionati 5 µl di materiale genetico estratto (step I) o di prodotto della prima amplificazione (step II) per un volume finale di 50 µl. La composizione di ogni miscela di reazione, la concentrazione di ogni reagente ed il profilo termico di ogni coppia di primers per l'amplificazione di entrambe le regioni dell'ORF pre-S/S di HBV-DNA impiegate in questo studio sono riportate in Tabella 26.

ORF pre-S/S di HBV-DNA - Set A			
<i>Miscela di reazione (step I e II) per singolo campione</i>			
<i>Reagenti</i>		<i>Concentrazione Finale</i>	
Buffer		1x	
dNTPs		200 $\mu$ M	
primer sense		1 $\mu$ M	
primer anti-sense		1 $\mu$ M	
Taq polimerasi		2U	
* Alla miscela di reazione sono stati aggiunti 5 $\mu$ l di materiale estratto (step I) o prodotto della prima amplificazione (step II)			
** La miscela di reazione è stata portata a volume con un'adeguata quantità di acqua per biologia molecolare (DNasi/RNasi free)			
<i>Profilo termico step I</i>		<i>Profilo termico step II</i>	
95°C 5 min	1 ciclo	95°C 5 min	1 ciclo
95°C 45 sec		95°C 30 sec	
62°C 45 sec	35 cicli	62°C 30 sec	35 cicli
72°C 1 min		72°C 30 sec	
72°C 10 min	1 ciclo	72°C 10 min	1 ciclo

ORF pre-S/S di HBV-DNA - Set B			
<i>Miscela di reazione (step I e II) per singolo campione</i>			
<i>Reagenti</i>		<i>Concentrazione Finale</i>	
Buffer		1x	
dNTPs		240 $\mu$ M	
primer sense		0.8 $\mu$ M	
primer anti-sense		0.8 $\mu$ M	
Taq polimerasi		1U	
* Alla miscela di reazione sono stati aggiunti 5 $\mu$ l di materiale estratto (step I) o prodotto della prima amplificazione (step II)			
** La miscela di reazione è stata portata a volume con un'adeguata quantità di acqua per biologia molecolare (DNasi/RNasi free)			
<i>Profilo termico step I</i>		<i>Profilo termico step II</i>	
94°C 2 min	1 ciclo	94°C 2 min	1 ciclo
94°C 15 sec		94°C 15 sec	
60°C 45 sec	25 cicli	60°C 45 sec	25 cicli
72°C 45 sec		72°C 45 sec	
72°C 10 min	1 ciclo	72°C 10 min	1 ciclo

Tabella 26: Composizione della miscela di reazione, concentrazione dei reagenti e profilo termico utilizzato per l'amplificazione delle due diverse regioni dell'ORF pre-S/S di HBV-DNA.

Per ogni seduta di n-PCR sono stati impiegati un controllo positivo ed almeno un controllo negativo che corrispondevano agli stessi controlli processati insieme ai campioni in studio in fase di estrazione.

Tutte le reazioni di amplificazione sono state eseguite con l'impiego di un termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

## Visualizzazione dei prodotti di amplificazione

La visualizzazione dei prodotti di amplificazione è stata condotta mediante elettroforesi in gel d'agarosio al 2% addizionato a bromuro d'etidio, potente intercalante degli acidi nucleici.

In ciascun pozzetto del gel sono stati seminati 10  $\mu$ l del prodotto della seconda amplificazione e 2  $\mu$ l di blu di bromofenolo per agevolare la precipitazione del campione sul fondo del pozzetto. Parallelamente agli amplificati è stato seminato un marcatore di peso molecolare (DNA ladder 100 bp). È stata quindi indotta una corsa elettroforetica con differenza di potenziale di 150 Volt per circa 30 minuti. I prodotti di amplificazione, evidenziati mediante trans illuminazione con raggi UV, erano visibili come bande fluorescenti (Figura 50).

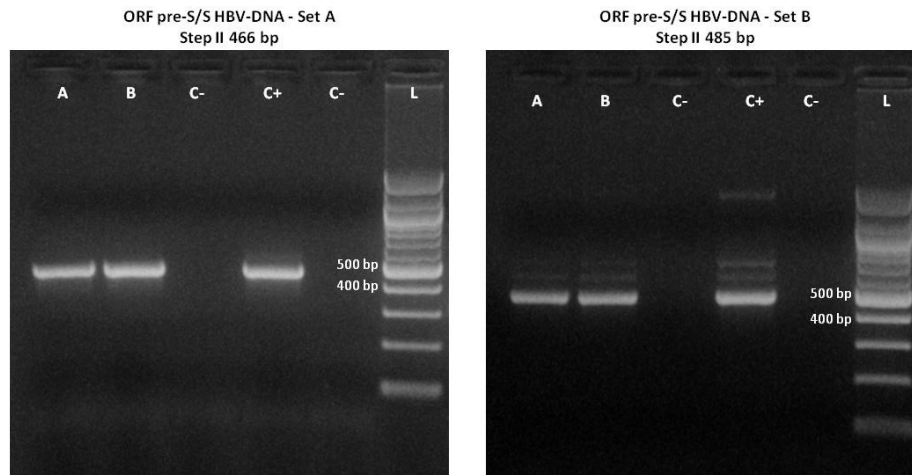


Figura 50: Esito di una corsa elettroforetica su gel d'agarosio per le due regioni dell'ORF pre-S/S di HBV-DNA. Le bande in corrispondenza dei pozzetti A e B corrispondono a campioni risultati positivi per HBV-DNA. Nel pozzetto C+ è stato seminato il controllo positivo, in C- il controllo negativo, mentre nel pozzetto indicato con la lettera L è stato seminato il DNA ladder 100bp.

## Sequenziamento ed analisi filogenetica

I prodotti di PCR sono stati successivamente purificati mediante kit di purificazione BigDye X Terminator (Applied Biosystem). Il sequenziamento diretto, condotto con metodo Sanger, è stato eseguito mediante l'impiego del sequenziatore automatico 3500 Genetic Analyzers (Applied Biosystem), basato sulla tecnologia dell'elettroforesi capillare, utilizzando il kit di sequenziamento BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystem). Per il sequenziamento sono stati impiegati gli stessi primers utilizzati nello step II di n-PCR.

Le sequenze nucleotidiche ottenute dall'amplificazione delle due regioni dell'ORF pre-S/S di HBV-DNA di ogni soggetto in studio sono state allineate l'una con l'altra ed unite in un'unica sequenza consenso per ciascun individuo (circa 500 bp ciascuna). Ogni sequenza nucleotidica in studio è stata quindi confrontata con altre sequenze di riferimento presenti in banca dati (GenBank)<sup>354</sup>. L'allineamento delle sequenze è stato eseguito tramite il programma Clustal X<sup>355</sup>. Il grado di omologia tra le sequenze è stato determinato tramite le distanze genetiche, calcolate mediante una matrice di distanza basata sul modello evolutivo Kimura 2 parametri<sup>356</sup> (rapporto transizione/trans versione = 2) utilizzando l'algoritmo Neighbor Joining<sup>357</sup> per generare gli alberi corrispondenti. La distanza genetica esistente tra la sequenza esaminata e quelle di riferimento è stata calcolata in 10,000 replicati, ottenendo così l'albero filogenetico finale tramite il programma MEGA 5<sup>358</sup>.

Per l'analisi filogenetica sono state utilizzate sequenze di riferimento di genomi completi di HBV di diverso genotipo (A-J) recuperate dalla banca dati GenBank. Dall'analisi dell'albero filogenetico è stato possibile determinare il genotipo virale di ogni sequenza nucleotidica in studio.

Le sequenze di riferimento presenti in banca dati sono qui di seguito elencate con relativo numero di accesso e provenienza geografica:

#### *GENOTIPO A*

AB064314 USA; AB076678 Malawi; AB194951 Cameroon; AF090841 Belgium; AF536524 USA; AF537371 USA; AM180623 Mali; AM180624 Cameroon; AM184125 Gambia; AY034878 USA; AY128092 Canada; AY233275 South Africa; AY233286 South Africa; AY934765 Somalia; AY934771 Somalia; DQ020003 United Arab Emirates; FJ692554 Nigeria; FM199974 Rwanda; FM199979 Rwanda; GQ331048 Belgium; X02763 USA; X51970 Germany; X70185 Germany; Z35717 Poland; Z72478 Germany.

#### *GENOTIPO B*

AB010290 Japan; AB033554 Indonesia; AB073831 Thailand; AB073835 Vietnam; AB073839 Taiwan; AB073855 Japan; AB115551 Cambodia; AB205122 Vietnam; AB219426 Philippines; AB219428 Philippines; AF100309 China; AF282918 China; AY033072 Netherlands; D00329 Japan; D00331 Indonesia; D23678 Japan; DQ463795 Canada; DQ463798 Canada; DQ463801 Canada; M54923 Indonesia.

#### *GENOTIPO C*

AB014362 Japan; AB014381 Japan; AB074756 Thailand; AB112063 Vietnam; AB112066 Myanmar; AB112471 Thailand; AB117758 Cambodia; AB205123 China; AB493837 Indonesia; AB540583 Indonesia; AB554014 Indonesia; AB560662 Indonesia; AB644280 Indonesia; AF068756 Thailand; AF458664 China; AP011104 Indonesia; AY066028 China; AY123041 Japan; AY167099 Taiwan; GQ358157 Indonesia; HM011493 Indonesia; S75184 Japan; X04615 Japan; X75656 Polynesia; X75665 New Caledonia.

#### *GENOTIPO D*

AB033558 Japan; AB104711 Egypt; AB493846 Papua; AB583680 Pakistan; AY090453 Sweden; AY233296 South Africa; AY902773 USA; EU594410 Estonia; EU594434 Estonia; FJ386590 China; FJ692507 Haiti; GQ205377 India; GQ205384 India; GQ477453 Poland; GQ922000 Canada; GU456635 Iran; GU456664 Iran; GU456673 Iran; JF754597 Turkey; JN642129 Lebanon; M32138 Japan; U95551 USA; X65259 Italy; X85254 Italy.

#### *GENOTIPO E*

AB032431 Cote d'Ivoire; AB091255 Cote d'Ivoire; AB091256 Cote d'Ivoire; X75657 Western Africa; X75664 Senegal.

#### *GENOTIPO F*

AB036910 Venezuela; AF223962 Argentina; AF223963 Argentina; AF223965 Argentina; AY090455 Nicaragua; AY090458 Costa Rica; AY090459 Costa Rica; AY090461 El Salvador; X69798 Brazil; X75658 France.

#### *GENOTIPO G*

AB056513 USA; AB056514 USA; AB064310 USA; AB064311 USA; AB064312 USA; AB064313 USA; AF160501 USA; AF405706 Germany.

#### *GENOTIPO H*

AB298362 Japan; AB516394 Mexico; AB846650 Japan; AP007261 Japan; AY090454 Nicaragua; AY090457 Nicaragua; AY090460 USA; EF157291 Japan.

#### *GENOTIPO I*

AB231908 Vietnam; AF241407 Vietnam; FJ023660 Laos; GU357844 China.

#### *GENOTIPO J*

AB486012 Borneo-Japan.

### **Analisi di mutanti virali**

L'allineamento nucleotidico, costituito da ogni sequenza in studio e dalle sequenze di riferimento di uguale genotipo recuperate dalla banca dati ed utilizzate per la precedente analisi filogenetica, è stato convertito in allineamento amminoacidico con l'impiego del programma bioinformatico BioEdit.

Ogni sequenza amminoacidica in studio è stata analizzata e confrontata con le sequenze wild type di riferimento nella regione MHR di HBsAg (amminoacidi 103-173), in particolare nella porzione amminoacidica corrispondente al determinante  $\alpha$ , per l'individuazione di eventuali mutazioni che avrebbero potuto alterare l'antigenicità dell'intera proteina tanto da non essere riconosciuta dagli anticorpi anti-HBs neutralizzanti prodotti post-immunizzazione primaria e, quindi, determinare l'infezione da HBV in soggetti opportunamente vaccinati.

### **Analisi Statistica**

Sia per tutti i casi di epatite B acuta sia per i casi di epatite B acuta opportunamente vaccinati è stata calcolata l'età mediana con rispettivo range (valore minimo - valore massimo).

Il test del Chi Quadrato di Pearson o il test esatto di Fisher, quando necessari, sono stati impiegati per valutare le differenze delle variabili discrete tra gruppi, ad esempio casi vaccinati/non vaccinati, aree geografiche ed anno della diagnosi di epatite B acuta. Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per indagare le differenze significative tra i gruppi per le variabili continue.

Valori di  $p < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi. L'analisi statistica è stata condotta con l'impiego del software Stata Statistical versione 3.1.

## **RISULTATI**

### **Popolazione arruolata**

Nel periodo 1993-2014, sono stati notificati al SEIEVA un totale di 12,472 casi di epatite virale acuta di tipo B (Figura 51). Per 11,311 casi erano disponibili informazioni chiare ed univoche sullo stato vaccinale anti-epatite B; tali soggetti hanno quindi costituito la popolazione arruolata nello studio.

Tre quarti della popolazione arruolata era di genere maschile (74.9% maschi e 25.1% femmine) e complessivamente l'età mediana è risultata pari a 36 anni (range 0-100). Tuttavia, l'età mediana degli individui con epatite B acuta è andata significativamente ad aumentare con il passare del tempo, risultando pari a 26 anni nel 1993 e 46 anni nel 2014 ( $p < 0.001$ ).

La popolazione arruolata nello studio è stata quindi suddivisa tra casi di epatite B acuta in non vaccinati e casi in vaccinati (riceventi di almeno una dose di vaccino anti-HBV).

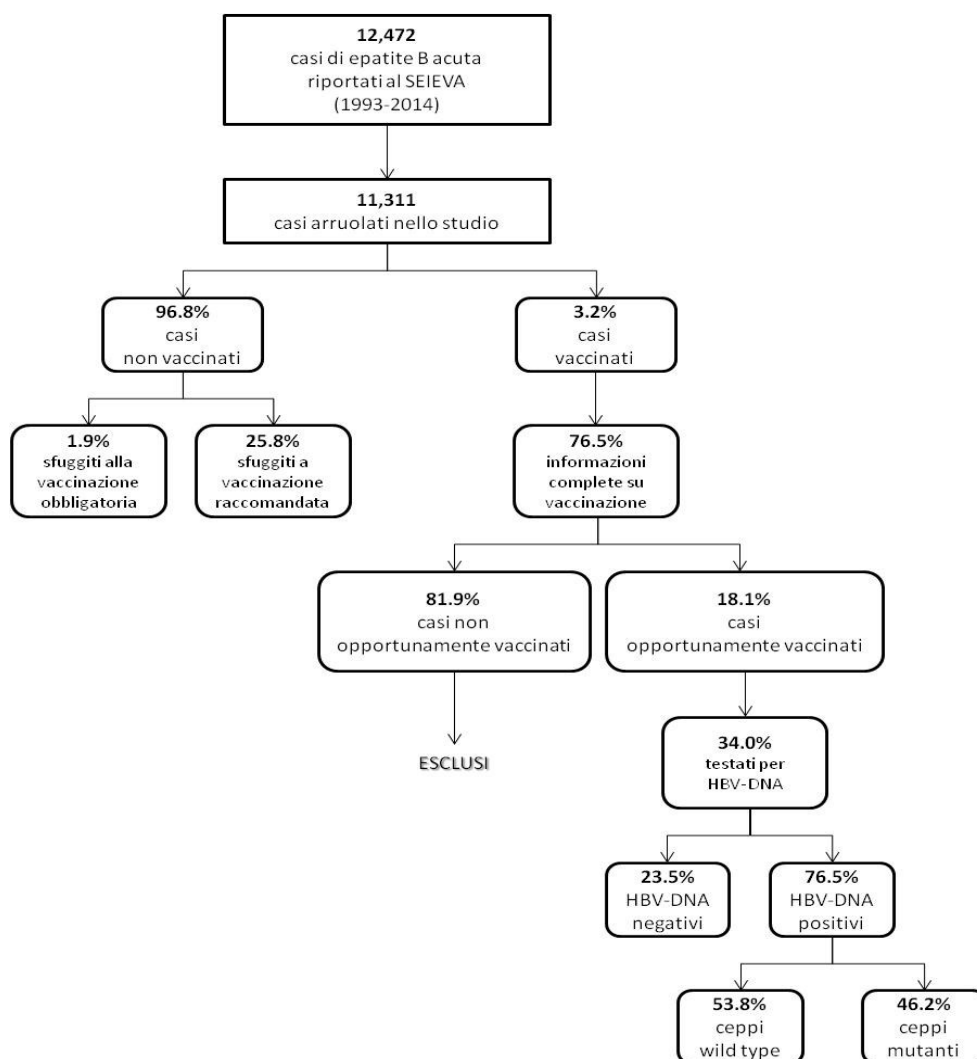


Figura 51: Riassunto dei risultati dello studio.

## Casi di epatite B acuta in non vaccinati

Nel periodo in studio, tra la popolazione arruolata sono stati individuati 10,949 (96.8%) casi di epatite B acuta in soggetti non vaccinati (Figura 51).

Si trattava principalmente di individui di genere maschile (75.2% maschi e 24.8% femmine), con la fascia d'età più rappresentata compresa tra 25 e 54 anni (31.0% tra 25-34 anni e 38.7% tra 35-54 anni) (Tabella 27). Svitati erano i fattori di rischio associati all'infezione: principalmente l'esposizione parenterale per trattamenti estetici, tatuaggi, piercing e pratiche di medicina alternativa (32.1%), seguita da cure odontoiatriche (30.8%), rapporti sessuali a rischio con partner multipli (27.7%) o non protetti (20.9%). La quasi totalità dei casi sono stati ospedalizzati (93.5%), hanno manifestato ittero (85.2%) ed alterazioni della funzionalità epatica.

<b>Casi di epatite B acuta non vaccinati (N = 10949)</b>			
		<b>N.</b>	<b>%</b>
<b>Genere</b>	maschio	8176	75.2
	femmina	2703	24.8
<b>Età (anni)</b>	0-14	109	1.0
	15-24	1552	14.3
	25-34	3377	31.0
	35-54	4217	38.7
	≥55	1632	15.0
<b>Fattori di rischio §</b>	tossicodipendenza	1139	10.6
	esposizione nosocomiale *	1863	17.1
	esposizione parenterale **	3488	32.1
	cure odontoiatriche	3312	30.8
	convivenza con portatore cronico di HBsAg	871	10.4
	partner sessuali multipli (≥2)	2190	27.7
	rapporti sessuali non protetti ***	2076	20.9
<b>Caratteristiche cliniche e funzionalità epatica</b>			
	ospedalizzazione	10176	93.5
	ittero	9239	85.2
	AST (UI/ml), media [DS]	1453 [1059]	
	ALT (UI/ml), media [DS]	2357 [1375]	
	bilirubina totale (mg/dl), media [DS]	11.9 [11.4]	
	bilirubina diretta (mg/dl), media [DS]	9.0 [10.1]	
	rapporto di normalizzazione internazionale medio [DS]	1.5 [1.0]	

§ ciascun caso può avere più di un fattore di rischio

\* ospedalizzazione, emodialisi, interventi chirurgici, endoscopie, trasfusioni di sangue

\*\* piercing, tatuaggi, agopuntura, chiropratica, manicure, trattamenti estetici

\*\*\* mancato uso del profilattico durante i rapporti sessuali

Tabella 27: Caratteristiche associate ai casi di epatite B acuta in soggetti non vaccinati.

Tra i casi di epatite B acuta in soggetti non vaccinati, 213 (1.9%) si sono verificati in individui sfuggiti all'immunizzazione obbligatoria: in particolare 187 casi (87.8%) sono sfuggiti all'obbligo vaccinale da adolescenti e 26 (12.2%) alla vaccinazione nell'infanzia. Complessivamente, la distribuzione geografica di questi casi ha mostrato un significativo gradiente, con l'1.2% e l'1.7% dei casi distribuiti nel nord e centro Italia rispetto al 4.4% nell'Italia meridionale ( $p < 0.001$ ).

Inoltre, tra i soggetti non vaccinati 2,821 (25.8%) casi di epatite B acuta sono stati riscontrati in individui per i quali la vaccinazione anti-HBV era fortemente raccomandata ed offerta gratuitamente in quanto ad elevato rischio di esposizione all'infezione. Il trend di questi casi ha mostrato un significativo decremento annuo: 150-250 casi/anno nel periodo 1993-2001 rispetto a 40-60 casi/anno negli anni 2010-2014 ( $p < 0.001$ ). Come mostrato in Figura 52, la maggior parte dei 2,821 casi appartenenti ai gruppi ad elevato rischio di contrarre l'infezione da HBV erano tossicodipendenti ( $n=1047$ , 37.1%), di cui 135 (12.9%) afferenti a centri di recupero per la tossicodipendenza già prima dell'insorgenza della malattia, 843 (29.9%) erano conviventi di portatori cronici di HBsAg e 800 (28.4%) omosessuali o bisessuali maschi. Una percentuale ridotta era invece rappresentata da emodializzati e personale sanitario (rispettivamente 0.8% e 3.8%).

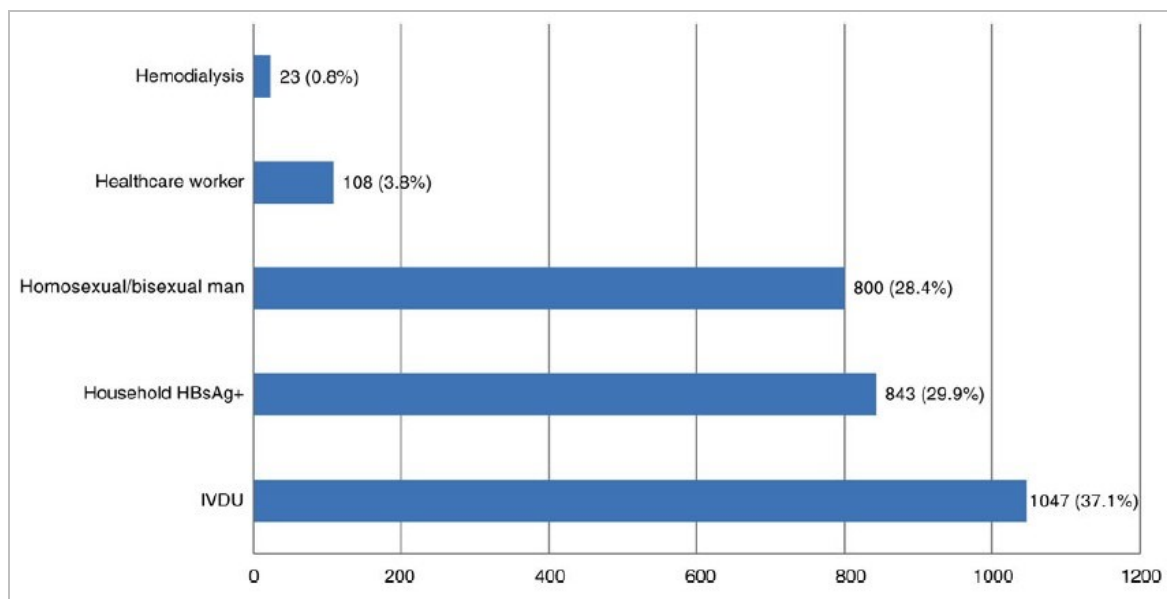


Figura 52: Distribuzione dei 2,821 casi di epatite B acuta tra soggetti non vaccinati appartenenti a gruppi a maggior rischio di esposizione a HBV.

Tra i conviventi di portatori cronici di HBsAg, 310 (36.8%) erano consapevoli dello stato infettivo del proprio convivente, tuttavia non si erano sottoposti alla vaccinazione. Per 285 di questi casi (91.9%) sono state raccolte informazioni sulle motivazioni della mancata immunizzazione anti-epatite B. Come mostrato in Tabella 28, la ragione principale è stata la mancanza di fiducia, l'attitudine negativa o le errate convinzioni nei confronti della vaccinazione (67.7%), seguita dalla mancata o insufficiente comunicazione (10.5%), scarsa percezione della severità della malattia (8.8%), dubbi sull'efficacia del vaccino (8.4%) oppure paura dei possibili effetti collaterali (4.6%).



<b>Motivi della mancata vaccinazione</b>	<b>N.</b>	<b>%</b>
Mancanza di fiducia, attitudine negativa ed errate convinzioni nei confronti della vaccinazione	193	67.7
Mancata o insufficiente comunicazione	30	10.5
Scarsa percezione della severità della malattia	26	8.8
Dubbi sull'efficacia del vaccino	24	8.4
Paura dei possibili effetti collaterali	13	4.6
<b>TOTALE</b>	<b>285</b>	<b>100.0</b>

Tabella 28: *Motivi della mancata vaccinazione tra i casi di epatite acuta conviventi di portatori cronici di HBsAg, consapevoli dello stato infettivo del proprio convivente.*

### **Casi di epatite B acuta in vaccinati**

Tra la popolazione arruolata, 362 (3.2%) casi di epatite B acuta avevano ricevuto almeno una dose di vaccino anti-HBV. La percentuale annua di casi in soggetti vaccinati non è variata significativamente durante tutto il periodo dello studio.

Informazioni complete relative alla schedula vaccinale anti-HBV (numero di dosi di vaccino anti-HBV somministrate, tempi di somministrazione tra una dose e l'altra, etc.) erano disponibili per 277 vaccinati (76.5%).

Dall'analisi dei dati è emerso che per la maggior parte (n=227, 81.9%) dei casi la schedula vaccinale non era stata propriamente eseguita o completata. Il vaccino era stato infatti somministrato come misura profilattica post-esposizione in 151 casi (66.5%) con un tempo mediano intercorso tra l'inoculazione del vaccino e l'insorgenza della malattia pari a 31 giorni (range 5-175). Inoltre, per 40 individui (17.6%) la schedula vaccinale è risultata incompleta: 24 (60.0%) hanno ricevuto una sola dose di vaccino, mentre 16 individui (40.0%) avevano ricevuto due dosi. A 36 soggetti (15.9%) erano state eseguite 3 inoculazioni di vaccino anti-HBV, ma con intervalli di tempo errati tra le somministrazioni: 1 individuo (2.8%) ha ricevuto la seconda dose 25 mesi dopo la prima, mentre per 35 soggetti (97.2%) è stato registrato un intervallo di tempo mediano di 19 mesi (range 16-40) tra la seconda e la terza dose. Tutti i soggetti con deviazioni nella schedula vaccinale raccomandata per l'immunizzazione primaria anti-HBV sono stati esclusi dall'analisi dei dati.

Pertanto, i restanti 50 individui (50/277 o 18.1%) costituivano la popolazione inclusa nello studio in quanto soggetti vaccinati correttamente secondo la schedula vaccinale raccomandata, ma che avevano in seguito contratto l'infezione da HBV (casi opportunamente vaccinati). La distribuzione nel tempo di questi casi è risultata uniforme per tutto il periodo dello studio.

Si trattava principalmente di soggetti di genere maschile (74.0% maschi e 26.0% femmine), con un'età mediana complessiva di 30 anni (range 2.79 anni) in cui la fascia d'età più rappresentata era 35-54 anni (34.0%). I casi opportunamente vaccinati avevano sviluppato epatite B acuta dopo circa 7.5 anni dal completamento del ciclo vaccinale primario (range 223 giorni-21.5 anni). I principali fattori di rischio erano l'esposizione parenterale (30.6%) e le cure odontoiatriche (32.7%), seguiti da rapporti sessuali con partner multipli (22.6%), convivenza con portatori cronici di HBsAg (21.6%) e

tossicodipendenza (20.4%). La quasi totalità dei casi sono stati ospedalizzati (86.0%), hanno manifestato ittero (84.0%) ed alterazioni della funzionalità epatica.

In Tabella 29 sono presentate le caratteristiche demografiche, i fattori di rischio, le caratteristiche cliniche ed i valori di funzionalità epatica dei casi di epatite B opportunamente vaccinati, messe a confronto con le medesime caratteristiche riguardanti il gruppo dei casi non vaccinati.

Dal confronto è emerso che i casi opportunamente vaccinati erano significativamente più giovani ( $p < 0.001$ ), sono stati meno frequentemente ospedalizzati ( $p < 0.042$ ) e presentavano livelli medi di ALT e AST inferiori rispetto ai casi non vaccinati (rispettivamente  $p < 0.011$  e  $p < 0.039$ ). Per quanto riguarda i fattori di rischio, invece, la percentuale di tossicodipendenti e di conviventi di portatori cronici di HBsAg era significativamente più elevata tra i vaccinati rispetto ai non vaccinati ( $p < 0.035$  e  $p < 0.026$ , rispettivamente).

Caratteristica		Casi non vaccinati		Casi opportunamente vaccinati		p value
		N = 10949		N = 50		
		N	%	N	%	
<b>Genere</b>	maschio	8176	75.2	37	74.0	ns
	femmina	2703	24.8	13	26.0	
<b>Età (anni)</b>	0-14	109	1.0	5	10.0	<0.001
	15-24	1552	14.3	13	26.0	
	25-34	3377	31.0	13	26.0	
	35-54	4217	38.7	17	34.0	
	≥55	1632	15.0	2	4.0	
<b>Fattori di rischio §</b>	tossicodipendenza	1139	10.6	10	20.4	0.035
	esposizione nosocomiale *	1863	17.1	8	16.0	ns
	esposizione parenterale **	3488	32.1	15	30.6	ns
	cure odontoiatriche	3312	30.8	16	32.7	ns
	convivenza con portatore cronico di HBsAg	871	10.4	8	21.6	0.026
	partner sessuali multipli (≥2)	2190	27.7	7	22.6	ns
	rapporti sessuali non protetti ***	2076	20.9	7	17.1	ns
<b>Caratteristiche cliniche e funzionalità epatica</b>						
	ospedalizzazione	10176	93.5	43	86.0	0.042
	ittero	9239	85.2	42	84.0	ns
	AST (UI/ml), media [DS]	1453 [1059]		1060 [812]		0.039
	ALT (UI/ml), media [DS]	2357 [1375]		1730 [1213]		0.011
	bilirubina totale (mg/dl), media [DS]	11.9 [11.4]		8.3 [6.7]		ns
	bilirubina diretta (mg/dl), media [DS]	9.0 [10.1]		10.0 [20.0]		ns
	rapporto di normalizzazione internazionale medio [DS]	1.5 [1.0]		1.2 [0.1]		ns

§ ciascun caso può avere più di un fattore di rischio

\* ospedalizzazione, emodialisi, interventi chirurgici, endoscopie, trasfusioni di sangue

\*\* piercing, tatuaggi, agopuntura, chiropratica, manicure, trattamenti estetici

\*\*\* mancato uso del profilattico

Tabella 29: Caratteristiche dei casi di epatite B acuta in soggetti non vaccinati vs opportunamente vaccinati.

## **Caratterizzazione molecolare dei ceppi infettanti i casi opportunamente vaccinati**

Per 17 (34.0%) dei 50 casi di epatite B acuta in soggetti opportunamente vaccinati era disponibile un campione di siero per indagare la presenza di HBV-DNA ed effettuare la caratterizzazione molecolare del ceppo infettante.

Per 13 individui (76.5%) è stata rilevata la presenza del genoma virale, in quanto il campione di siero testato è risultato positivo all'amplificazione delle due regioni dell'ORF pre-S/S utilizzate in questo studio.

L'albero filogenetico in Figura 53 mostra la distribuzione dei genotipi virali di HBV determinati nei soggetti in studio: la presenza del genotipo F è stata riscontrata in 5 casi (38.4%), il genotipo D in 4 casi (30.8%), il genotipo A in 2 casi (15.4%), mentre i genotipi B ed E in 1 caso ciascuno (7.7%).

La porzione di HBV-DNA dell'ORF pre-S/S impiegata in questo studio è stata analizzata per l'identificazione di eventuali mutazioni nucleotidiche che avrebbero potuto comportare una mutazione nella rispettiva sequenza amminoacidica (mutazioni missenso). In particolare, l'analisi della sequenza amminoacidica corrispondente alla regione MHR di HBsAg isolata dai campioni appartenenti ai 13 soggetti risultati positivi per HBV-DNA ha mostrato che in 7 casi (53.8%) era presente un ceppo virale wild type, mentre in 6 casi (46.2%) era presente una variante virale mutata. Ciascuna di queste varianti era caratterizzata dalla presenza di una sola variazione amminoacidica: le mutazioni amminoacidiche rilevate in ciascuno di tali ceppi sono illustrate in Figura 54 e corrispondono a G145R, T118K, T126A, Q129H, D144E, T143M.

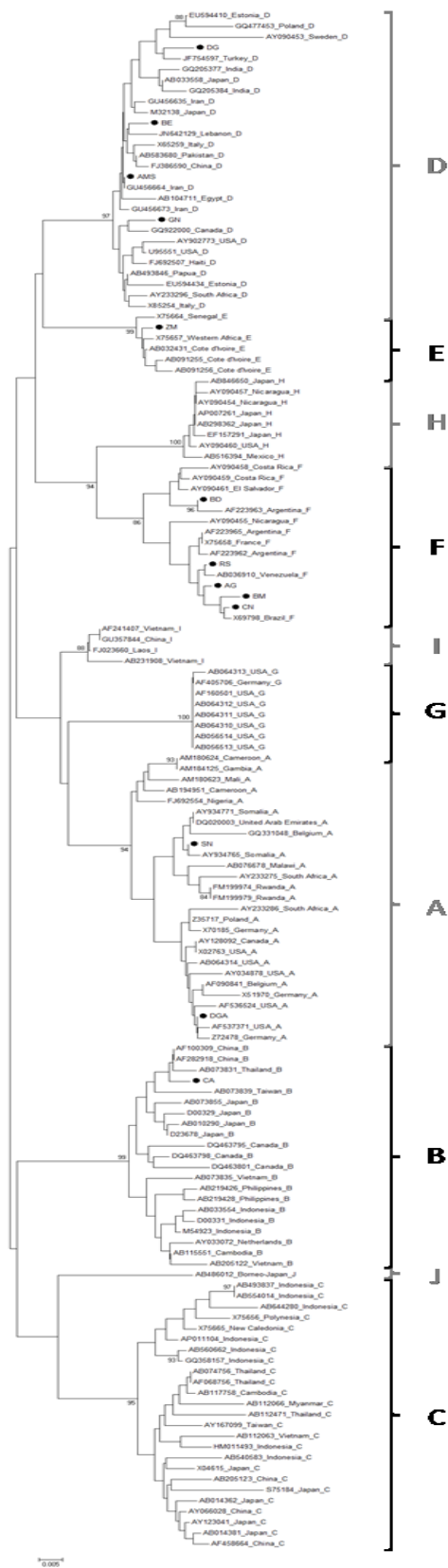
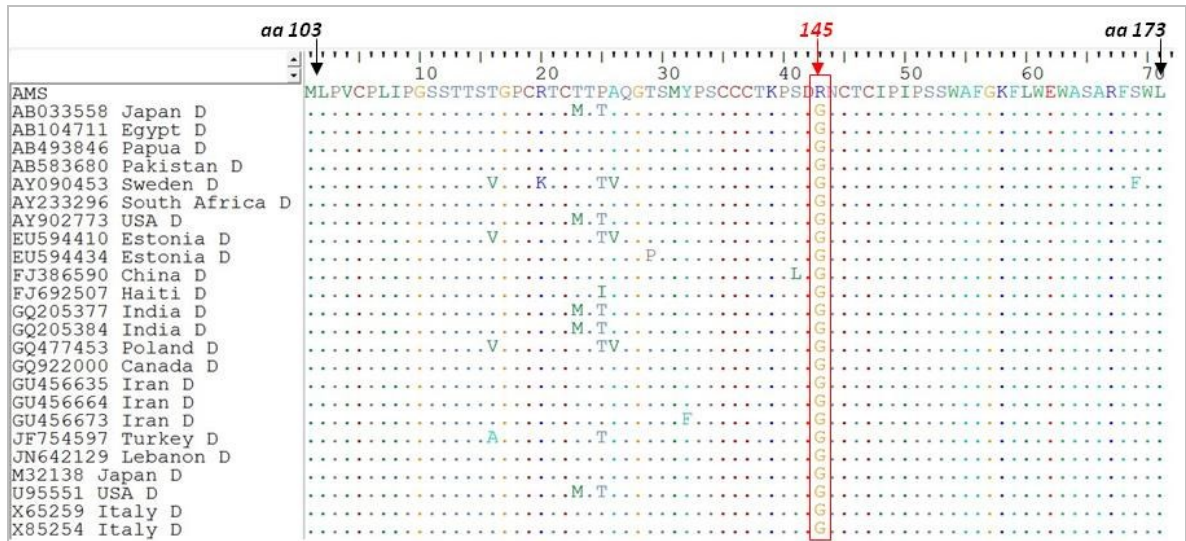
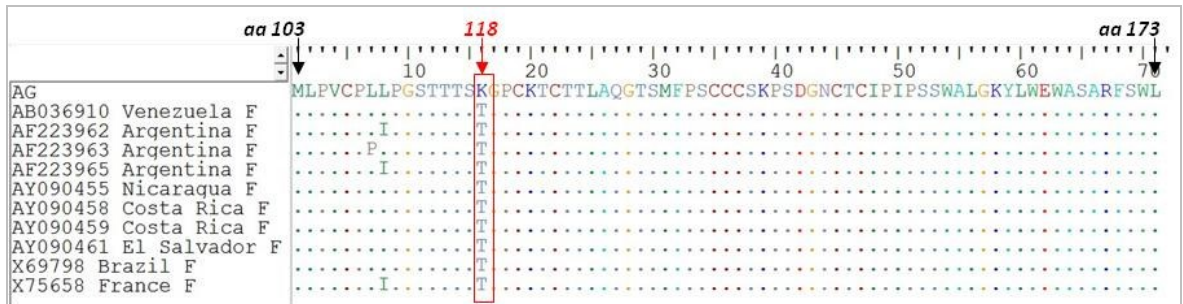


Figura 53: Albero filogenetico basato sull'ORF pre-S/S di HBV-DNA (400bp). L'analisi comprende 13 sequenze di casi di epatite B acuta opportunamente vaccinati (●) e sequenze di riferimento recuperate da GenBank.

Caso n. 1



Caso n.2



Caso n.3





Come riportato in Tabella 30, tre dei 6 casi infetti da ceppo mutante risultavano sieroprotetti, ovvero presentavano infezione da HBV nonostante la presenza di una concentrazione di anticorpi anti-HBs circolanti superiori al livello protettivo pari a 10 UI/l.

<b>Caso n.</b>	<b>Genotipo HBV</b>	<b>Mutazione</b>	<b>Concentrazione anti-HBs</b>
1	D	G145R	≥ 10 UI/l
2	F	T118K	≥ 10 UI/l
3	F	T126A	≥ 10 UI/l
4	D	Q129H	negativo
5	D	D144E	negativo
6	B	T143M	negativo

*Tabella 30: Caratteristiche molecolari dei ceppi di HBV mutati infettanti 6 casi opportunamente vaccinati e rispettiva concentrazione di anti-HBs.*

# *CONCLUSIONI*



## CONCLUSIONI

A distanza di oltre cinquant'anni dalla sua identificazione, il virus dell'epatite B è ancora oggi causa di una delle malattie infettive di maggior rilievo a livello mondiale. Si tratta di un virus a DNA appartenente alla famiglia *Hepadnaviridae* che, replicando a livello epatico, può causare infezioni acute o croniche a carico del fegato. Queste ultime, seppur spesso asintomatiche, possono evolvere in severe complicanze epatiche quali la cirrosi e l'epatocarcinoma. L'epidemiologia globale dell'epatite virale di tipo B è molto variabile, ma elevati tassi di morbosità e mortalità legati alle complicanze epatiche dell'infezione da HBV sono tutt'oggi riportati dal WHO, soprattutto nei Paesi più poveri del mondo<sup>2</sup>.

Dagli anni '80, l'epatite virale di tipo B è però una malattia prevenibile con la vaccinazione. L'immunizzazione attiva contro HBV, iniziata con l'impiego di vaccini plasma-derivati e poi adottata globalmente con l'utilizzo di vaccini ricombinanti (monovalenti o combinati), si rivela l'unica vera arma disponibile per fronteggiare l'infezione, sia in termini di sicurezza che di costi. In particolare, a partire dagli anni '90, a seguito delle raccomandazioni del WHO a tutti i Paesi del mondo di introdurre la vaccinazione universale anti-epatite B per neonati e/o adolescenti nei programmi vaccinali nazionali, è stato possibile osservare un drastico calo delle infezioni acute e croniche raggiungendo a livello mondiale straordinari risultati in termini di prevenzione e controllo dell'infezione e delle gravi sequele epatiche ad essa correlate<sup>2, 287-290,309,310,348</sup>.

L'Italia è stato uno dei primi Paesi ad aver introdotto la vaccinazione universale anti-epatite B nei suoi programmi di immunizzazione nazionali con risultati estremamente positivi sia dal punto di vista clinico, con la riduzione delle infezioni acute e dello stato di portatore, sia in termini economici<sup>204,331-337</sup>. Oggigiorno, in Italia si è giunti ad una situazione di controllo dell'infezione. L'esistenza di vaccini sicuri ed efficaci ed il successo della strategia vaccinale italiana pone le basi per sperare di arrivare ad una futura eliminazione della trasmissione di HBV. Tuttavia, in termini di sanità pubblica, per raggiungere in futuro tale obiettivo è necessario un costante monitoraggio nel tempo dell'efficacia delle misure preventive di immunoprofilassi attiva adottate contro tale infezione.

Il presente lavoro di tesi di dottorato raccoglie i risultati ottenuti da tre diversi studi condotti sul territorio nazionale, che hanno valutato sia l'immunogenicità a lungo termine dei vaccini anti-epatite B monovalenti (*Studio 1*) ed esavalenti (*Studio 2*) sia l'impatto della strategia vaccinale italiana sull'epidemiologia delle infezioni acute causate da HBV (*Studio 3*).

Il reale successo della vaccinazione universale anti-epatite B è legato alla persistenza di protezione nei confronti dell'agente patogeno a distanza di anni dal ciclo di immunizzazione primaria e soprattutto con l'inizio dell'adolescenza e successivamente dell'età adulta, quando le possibilità di esposizione al virus per via sessuale o per altri comportamenti a rischio aumentano notevolmente. È stato da tempo dimostrato che a seguito della somministrazione di 3 dosi di vaccino anti-epatite B (ciclo vaccinale primario) oltre il 95% degli individui immunizzati sviluppa anticorpi anti-HBs che raggiungono e superano la concentrazione definita protettiva (anti-HBs  $\geq 10$  UI/l); inoltre con la

vaccinazione vengono prodotte cellule della memoria in grado di riattivarsi in seguito a stimolazione antigenica, anche quando il livello anticorpale scende al di sotto della soglia protettiva<sup>283-286,343</sup>. Tuttavia, l'effettiva durata dell'immunità umorale e cellulare conferita dai vaccini monovalenti anti-epatite B non è stata ancora stabilita con certezza e l'eventuale necessità di dosi booster rimane tutt'oggi un tema dibattuto a livello internazionale.

Lo *Studio 1* del presente lavoro di tesi ha voluto incrementare i dati a livello nazionale e ha cercato di dare risposte a tali questioni ancora aperte. Si è trattato di uno studio retrospettivo multicentrico che ha previsto l'arruolamento di un gruppo di ragazzi vaccinati da bambini (3 dosi pediatriche di vaccino anti-epatite B ricombinante nel primo anno di vita) ed un gruppo di giovani adulti vaccinati da adolescenti (3 dosi adulte al dodicesimo anno di vita) per valutare, in entrambe le coorti, la persistenza dell'immunità umorale e cellulare 18-19 anni dopo l'immunizzazione primaria con vaccini monovalenti anti-epatite B. Dallo *Studio 1* è emerso che il 67.9% della popolazione presentava una concentrazione di anti-HBs superiore alla soglia protettiva (anti-HBs  $\geq 10$  UI/l) dopo circa due decenni dal ciclo vaccinale primario; in particolare 48.9% tra i vaccinati nel primo anno di vita e 87.0% tra i vaccinati da dodicenni. Altri studi condotti in Italia con un periodo di follow up comparabile a quello dello *Studio 1* hanno mostrato percentuali di sieroprotezione simili o di poco più elevate. Un recente studio condotto da *Coppola et al.* in due coorti di soggetti vaccinati rispettivamente da bambini e da adolescenti, reclutati tra gli iscritti ai corsi di laurea per professioni sanitarie e tra gli studenti o post-laureati della facoltà di medicina dell'Università di Napoli, ha rilevato una quota di individui con concentrazione di anti-HBs protettiva complessivamente pari a 84.2% a distanza di oltre 17 anni dall'immunizzazione primaria; in particolare in un sottogruppo della popolazione in studio la percentuale di soggetti con anti-HBs  $\geq 10$  UI/l era 93.6% per i vaccinati da dodicenni mentre risultava 77% per il gruppo dei soggetti vaccinati da bambini<sup>359</sup>. Anche altri due studi italiani, di cui uno condotto a livello nazionale mentre l'altro in un'area ad alta endemia per HBV del sud Italia, hanno riportato una più elevata frequenza di sieroprotetti tra soggetti vaccinati nel primo anno di vita (rispettivamente 75.8% e 75%), rispettivamente 17 e 18 anni dopo la serie vaccinale primaria<sup>331,360</sup>. Tuttavia le percentuali ottenute in questi ultimi due studi potrebbero essere sovrastimate se si considera che una certa quota di soggetti avrebbe avuto un'esposizione all'agente patogeno favorendo una risposta booster naturale. Anche nello studio di *Coppola et al.* la quota di individui con concentrazione di anti-HBs  $\geq 10$  UI/l a distanza di oltre 17 anni dal ciclo vaccinale primario potrebbe essere sovrastimata dato che l'intera popolazione in studio, per motivi professionali, aveva un maggior rischio di esposizione al virus e quindi maggiore possibilità di risposte booster naturali (seppur tutti anti-HBc negativi) nel periodo intercorso dall'immunizzazione primaria al momento dell'analisi. A livello internazionale, un recente studio condotto in Tunisia ha rilevato una percentuale di soggetti vaccinati contro HBV con titolo anticorpale protettivo pari a 68.9% dopo 17 anni dall'implementazione del programma di vaccinazione universale infantile; si tratta però di un Paese ad elevata endemia per HBV e quindi ancora una volta la quota di sieroprotetti potrebbe essere influenzata da risposte booster naturali<sup>361</sup>. Diversi altri studi condotti in differenti Paesi del mondo a distanza di circa 18-19 anni dal ciclo vaccinale primario anti-epatite B in coorti di giovani adulti immunizzati da bambini secondo la schedula vaccinale nazionale con vaccini anti-epatite B monovalenti hanno riportato frequenze simili o leggermente inferiori rispetto a quelle riscontrate nello *Studio 1* per i vaccinati nel primo anno di vita. In particolare, in uno studio condotto a Taiwan il

33.6% dei giovani adulti arruolati aveva concentrazione di anti-HBs  $\geq 10$  UI/l a distanza di oltre 18 anni dall'immunizzazione primaria anti-epatite B senza somministrazione di dosi booster e senza evidenze cliniche di esposizione al virus (anti-HBc e HBsAg negativi)<sup>362</sup>; uno studio condotto in Cina a distanza di 15-17 anni dalla vaccinazione primaria ha riscontrato una quota di sieroprotetti pari a 41.1%<sup>363</sup>; due studi condotti in Iran hanno riportato livelli di sieroprotezione rispettivamente pari a 37.0% e 42.6% a 20 anni dal ciclo vaccinale primario<sup>364,365</sup>; un recente trial clinico statunitense ha rilevato che solo nel 24% dei vaccinati entro il primo anno di vita persiste una concentrazione protettiva di anti-HBs a distanza di 15-18 anni dalla serie vaccinale primaria<sup>366</sup>.

La durata in circolo degli anticorpi anti-HBs dopo circa due decenni dalla vaccinazione primaria può quindi risultare molto variabile in base alla popolazione ed alla numerosità del campione analizzati. Un dato interessante che emerge dallo *Studio 1* consiste nel fatto che, nelle due coorti arruolate, sia la percentuale di individui con concentrazioni anticorpali protettive sia le GMC degli anticorpi anti-HBs sono risultate significativamente più alte tra i vaccinati da adolescenti rispetto ai vaccinati da bambini. Anche la proporzione di vaccinati con livelli di anticorpi anti-HBs al di sotto del limite di rilevazione del metodo ( $< 2$  UI/l) è significativamente maggiore nel secondo gruppo rispetto al primo. Questi risultati confermano ed estendono quanto ottenuto in un precedente studio italiano condotto da *Zanetti et al.* in cui è emerso che a distanza di 5 anni dall'immunizzazione primaria un maggiore declino degli anticorpi anti-HBs è avvenuto tra i vaccinati nel primo anno di vita rispetto ai vaccinati da dodicenni<sup>367</sup>. Altre testimonianze sul territorio nazionale hanno sottolineato la stessa tendenza: *Coppola et al.* hanno osservato che la frequenza di soggetti con concentrazione di anti-HBs  $< 10$  UI/l e quella di soggetti con anti-HBs  $> 400$  UI/l è rispettivamente significativamente più alta e più bassa nel gruppo di studenti vaccinati da bambini rispetto ai vaccinati da adolescenti oltre 17 anni dal ciclo vaccinale primario e questa differenza sembra correlata all'età in cui è stata effettuata la vaccinazione<sup>369</sup>; *Stroffolini et al.* hanno rilevato una maggiore tendenza a perdere livello anticorpale protettivo nella coorte di vaccinati nel primo anno di vita rispetto alla coorte dei dodicenni, in particolare tra coloro che hanno completato il ciclo vaccinale primario entro 10 anni rispetto ai vaccinati oltre 10 anni in cui non è stata osservata nessuna differenza statisticamente significativa nei due gruppi<sup>368</sup>. Seppur per i soggetti arruolati dello *Studio 1* non era noto il titolo anticorpale post-immunizzazione primaria, evidenze scientifiche dimostrano che la concentrazione di anticorpi anti-HBs indotti da vaccino diminuisce con il passare del tempo e la cinetica di tale decremento dipende dal picco anticorpale raggiunto a seguito di un ciclo vaccinale primario completo. In altre parole, maggiore è il titolo anticorpale post-immunizzazione primaria, più lunga sarà la persistenza in circolo degli anticorpi anti-HBs<sup>277-282,360,369</sup>. Diversi fattori possono svolgere un ruolo cruciale nel favorire elevate concentrazioni di anticorpi anti-HBs post-immunizzazione primaria e dunque incidere sulla loro persistenza in circolo con il passare del tempo: essi comprendono fattori genetici dell'ospite, l'età al momento della vaccinazione ed il differente dosaggio del vaccino somministrato<sup>262,263</sup>. Nello *Studio 1* la diversa persistenza degli anticorpi anti-HBs al di sopra della soglia protettiva nelle due coorti in esame a distanza di 18-19 anni dall'immunizzazione primaria potrebbe essere legata all'età in cui è stata somministrata la vaccinazione, sia in termini di sviluppo del sistema immunitario sia di dosaggio del vaccino somministrato. Infatti, i soggetti immunizzati nel primo anno di vita ricevono il vaccino anti-epatite B quando il sistema immunitario è ancora in fase di maturazione rispetto agli adolescenti che possiedono un sistema immunitario maturo; questo potrebbe indurre lo sviluppo di

un minore picco anticorpale nel primo gruppo rispetto al secondo che si traduce in un più rapido declino degli anticorpi anti-HBs a distanza di anni dalla vaccinazione. Inoltre, il dosaggio pediatrico prevede nella composizione vaccinale una concentrazione di antigene inferiore (generalmente dimezzata) rispetto a quella dell'adulto e dell'adolescente. Una maggiore persistenza degli anticorpi anti-HBs protettivi nei giovani adulti rispetto ai ragazzi può anche risiedere nel fatto che diverso è il possibile grado di esposizione naturale all'agente patogeno: al momento dell'analisi i vaccinati nel dodicesimo anno di vita avevano già raggiunto l'età adulta e quindi maggiore è stata la possibile esposizione ad HBV dato che i fattori di rischio legati all'infezione aumentano proprio con l'inizio dell'adolescenza ed il passaggio all'età adulta. Di conseguenza questi individui, grazie all'efficacia protettiva della vaccinazione anti-epatite B, possono essere entrati in contatto con il virus, aver sviluppato risposte booster naturali con un conseguente incremento della concentrazione di anticorpi anti-HBs in circolo seppur risultando anti-HBc negativi e senza aver mai avuto manifestazione clinica dell'infezione.

L'effettiva efficacia ed immunogenicità a lungo termine dei vaccini monovalenti anti-epatite B sono però dimostrate dal fatto che, indipendentemente dalla diversa concentrazione di anticorpi anti-HBs nelle due coorti in fase pre-booster ed indipendentemente dai fattori che ne hanno determinato un diverso titolo anticorpale a lungo termine, in entrambi i gruppi in esame la maggior parte degli individui con concentrazione di anti-HBs pre-booster al di sotto della soglia protettiva ha mostrato adeguata memoria immunologica con una buona risposta anamnesticca a seguito di una dose booster di vaccino anti-epatite B a distanza di 18-19 anni dall'immunizzazione primaria, con proporzioni di anti-HBs  $\geq 10$  UI/l e GMC simili nei due gruppi studiati (rispettivamente 94.2% e 477.9 UI/l nei ragazzi vs. 94.7% e 710.0 UI/l nei giovani adulti). In letteratura, diversi studi hanno evidenziato come la memoria immunologica sia in grado di persistere più a lungo degli anticorpi e riattivarsi anche quando la concentrazione anticorpale è ormai scesa al di sotto della soglia protettiva o addirittura gli anticorpi anti-HBs non sono più rilevabili in circolo, garantendo quindi protezione all'individuo nei confronti di un'eventuale esposizione al virus<sup>227,317,344-346,360,364-366</sup>. Inoltre, nello studio da noi condotto, valutando la concentrazione di anticorpi anti-HBs due settimane dopo il booster in relazione alla concentrazione di anti-HBs pre-booster, emerge per entrambe le coorte che il livello anticorpale pre-booster influenza il titolo anticorpale post-booster. In particolare, la maggior parte dei soggetti che hanno mantenuto livelli anticorpali post-booster al di sotto della soglia protettiva (anti-HBs  $< 10$  UI/l) erano soggetti con anti-HBs pre-booster al di sotto del limite di rilevazione del metodo (2 UI/l), mentre per la maggior parte dei soggetti con anti-HBs pre-booster tra 2.0 e 9.9 UI/l è stata rilevata una concentrazione post-booster  $> 100$  UI/l. La correlazione tra concentrazione anticorpale pre- e post-booster era già stata osservata precedentemente in altri studi nazionali<sup>360,367,369</sup> ed internazionali<sup>362,370-373</sup>. In un recente studio condotto da *Chiara et al.* è stato osservato che l'induzione di una forte risposta immunologica post-booster è correlata al titolo anticorpale pre-booster, in particolare livelli di anti-HBs pre-booster  $\geq 2$  UI/l sarebbero in grado di assicurare una concentrazione post-booster superiore alla soglia protettiva, mentre anti-HBs pre-booster  $< 2$  UI/l sono associati ad una maggiore probabilità di non risposta al booster (anti-HBs post-booster  $< 10$  UI/l)<sup>369</sup>. Gli autori concludono che la concentrazione anticorpale pre-booster  $\geq 2$  UI/l possa essere predittiva di un'adeguata risposta anamnesticca in seguito a stimolazione antigenica, mentre i soggetti con titolo  $< 2$  UI/l potrebbero essere dei non-responders che necessitano un nuovo

ciclo vaccinale completo. Dallo *Studio 1* di questo lavoro di tesi non si evince chiaramente quanto sostenuto da *Chiara et al*, poiché se è vero che per il gruppo di giovani adulti l'unico soggetto con anti-HBs post-booster inferiore alla soglia protettiva aveva effettivamente concentrazione anti-HBs pre-booster <2 UI/l, per il gruppo dei ragazzi non tutti quelli risultati anti-HBs post-booster <10 UI/l appartenevano al sottogruppo di anti-HBs pre-booster <2 UI/l. Il numero degli individui indagati nello *Studio 1* per questa correlazione è comunque troppo piccolo per trarre conclusioni, ma sicuramente il significato della correlazione tra concentrazione anticorpale pre- e post-booster necessita ulteriori conferme, in quanto potrebbe essere un aiuto per lo sviluppo di appropriate strategie vaccinali future.

Nonostante a distanza di 18-19 anni dall'immunizzazione primaria sia stata dimostrata la persistenza della memoria immunologica contro HBV, una piccola quota di soggetti ha mantenuto livello anticorpale non protettivo anche in seguito a stimolazione antigenica mediante la somministrazione di una dose booster di vaccino anti-epatite B. Poiché in Italia l'esecuzione di test per valutare il titolo anticorpale post-vaccinazione non è prevista per legge, non è nota la concentrazione di anti-HBs post-immunizzazione primaria per i soggetti in studio. Non è quindi possibile stabilire con certezza se si è trattato di individui che hanno perso la memoria immunologica con il passare del tempo oppure se costituivano quella percentuale di soggetti non-responders con risposta B cellulare sub-ottimale a seguito di un ciclo vaccinale primario completo. Si potrebbe anche ipotizzare che si tratti di soggetti ipo-responders, ovvero soggetti che avendo basso titolo anticorpale al termine della serie vaccinale primaria, con il passare degli anni hanno perso concentrazioni protettive di anticorpi circolanti e per i quali il sistema immunitario a due settimane dalla somministrazione di un booster non ha avuto sufficiente tempo per innescare un'efficace risposta anamnestic. In questo caso tali soggetti non risulterebbero comunque suscettibili ad un'infezione da HBV poiché, considerando il lungo periodo di incubazione, a seguito di esposizione al virus il sistema immunitario del soggetto avrebbe il tempo per reagire e conferire protezione nei confronti di un'infezione acuta, ma soprattutto per evitare l'insorgenza dello stato di portatore cronico. Complessivamente, la percentuale dei soggetti rilevati anti-HBs <10 UI/l nello *Studio 1* è attualmente tanto piccola da non destare preoccupazione per la strategia vaccinale italiana con vaccini anti-epatite B monovalenti, seppur necessita di un continuo monitoraggio nel tempo.

Infine, nello *Studio 1* del presente lavoro di tesi, l'efficacia della vaccinazione anti-epatite B con vaccini monovalenti è testimoniata anche dal fatto che 8 dei soggetti arruolati (tutti appartenenti alla coorte dei giovani adulti) sono risultati positivi per anti-HBc ma negativi per gli altri marcatori virali. La positività per anti-HBc è generalmente indice di esposizione ad HBV. Per questi soggetti non erano però disponibili dati epidemiologici sia prima sia dopo l'immunizzazione primaria e quindi non è stato possibile stabilire con certezza se si trattava di individui che si erano già esposti prima della vaccinazione primaria o se l'esposizione è avvenuta in seguito. Tuttavia, poiché nessun soggetto anti-HBc positivo presentava segni clinici di infezione possiamo pensare che il contagio sia avvenuto nel momento in cui l'individuo già risultava immunizzato contro il virus. Possiamo quindi sostenere che si è trattato di infezioni benigne in cui l'immunità umorale e/o cellulare conferita dalla vaccinazione ha permesso di garantire protezione e soprattutto ha permesso di prevenire l'insorgenza di infezioni croniche. In particolare, un soggetto risultato anti-HBc positivo presentava concentrazione di anti-HBs pari a 0.0 UI/l; la presenza di positività per anti-HBc in assenza di anti-HBs rilevabili in circolo e di

altri segni clinici di infezione è la conseguenza di 3 possibili situazioni: a) risultato falso-positivo al test per anti-HBc, b) infezione occulta da HBV con presenza di HBV-DNA al di sotto del limite di rilevazione del metodo, c) risoluzione di un'infezione naturale con declino degli anticorpi anti-HBs al di sotto della soglia protettiva. La possibilità di risultati falsi-positivi legati ad una specificità sub-ottimale dei test per la rilevazione di anticorpi anti-HBc è già stata precedentemente osservata in coorti di soggetti vaccinati<sup>374,375</sup>, inoltre alcuni lavori hanno rilevato un'alta frequenza di risultati non-specifici per anti-HBc nello screening di campioni ottenuti da popolazione sana<sup>376-379</sup>. Analogamente la letteratura riporta come sia possibile un rapido declino degli anticorpi anti-HBs in seguito ad esposizione al virus, tuttavia in questi soggetti si osserva una rapida risposta anamnesticca a seguito di una dose booster di vaccino anti-epatite B<sup>374</sup>. Nel nostro studio tutti i soggetti anti-HBc positivi non hanno ricevuto la dose booster di vaccino, pertanto non è stato possibile osservare tale fenomeno. Tuttavia, considerata l'elevata immunogenicità a lungo termine dimostrata per i vaccini monovalenti anti-epatite B, è verosimile pensare che la risoluzione di un'infezione naturale con declino degli anticorpi anti-HBs al di sotto della soglia protettiva possa essere l'opzione più plausibile per spiegare la positività isolata per anti-HBc. Sicuramente il significato di positività per anti-HBc in individui correttamente immunizzati e di conseguenza il continuo monitoraggio dell'efficacia protettiva della vaccinazione anti-epatite B a distanza di anni dal ciclo primario devono essere ulteriormente indagati. Ad oggi, altri studi sull'immunogenicità della vaccinazione anti-epatite B hanno documentato l'insorgenza di infezioni benigne con sierconversione per anti-HBc in soggetti immunizzati in cui l'efficacia protettiva della vaccinazione ha evitato lo sviluppo di condizioni di portatore cronico di HBV<sup>367,380</sup>. Infine, nello *Studio 1* l'individuazione di soggetti anti-HBc positivi solo nella coorte dei vaccinati da dodicenni sottolinea nuovamente come maggiore sia la possibilità di esposizione al virus durante l'adolescenza e l'età adulta, rimarcando l'importanza della protezione per HBV quando aumenta il rischio di contagio.

In conclusione, dallo *Studio 1* di questo lavoro di tesi emerge che a distanza di 18-19 anni dall'immunizzazione primaria anti-epatite B con vaccini monovalenti, il 67.9% degli individui risulta ancora protetto nei confronti dell'infezione da HBV per persistenza dell'immunità umorale; a questi si deve aggiungere un 94.2% di individui che, dopo somministrazione di una dose booster, mostrano la persistenza dell'immunità cellulare. In particolare, data l'elevata percentuale di individui con memoria immunologica a distanza di due decadi dalla serie vaccinale primaria, dosi booster di vaccino anti-epatite B non sembrano necessarie per prevenire infezioni acute e croniche da HBV se la vaccinazione è stata eseguita correttamente con 3 dosi di vaccino monovalente anti-epatite B somministrato ai tempi 3, 5, 11 mesi del primo anno di vita per i bambini e 0, 1, 6 mesi per gli adolescenti. Recentemente, *Bruce et al.* hanno dimostrato che l'88% dei vaccinati che perdono protezione anticorpale mantengono memoria immunologica fino a 30 anni di distanza dalla vaccinazione primaria anti-epatite B<sup>289</sup>. Tuttavia, altri studi, soprattutto di origine asiatica, sottolineano invece che la memoria immunologica tende a svanire dopo la seconda decade dall'immunizzazione primaria, suggerendo la necessità di dosi booster<sup>291-296</sup>. Studi futuri di follow up per monitorare nel tempo l'efficacia a lungo termine della vaccinazione anti-epatite B con composizioni vaccinali monovalenti sono dunque necessari, soprattutto per capire il reale significato di un'eventuale perdita di risposta anamnesticca post-booster in termini di possibilità di ritornare suscettibili all'infezione da HBV.

In Italia, a partire dal 1999 i vaccini monovalenti sono stati gradualmente sostituiti da vaccini combinati, tra cui due composizioni vaccinali esavalenti (Hexavac, Sanofi Pasteur MSD, e Infanrix Hexa, GlaxoSmithKline) introdotte nel 2001, in grado di prevenire l'epatite B, il tetano, la difterite, la pertosse, la poliomielite e le malattie invasive da *Haemophilus influenzae* di tipo b. Le composizioni vaccinali combinate presentano diversi vantaggi: riducono il numero delle iniezioni e quindi aumentano l'accettabilità della vaccinazione soprattutto tra le fasce d'età più piccole della popolazione, semplificano la schedula vaccinale per i programmi di immunizzazione dell'infanzia evitando la perdita di soggetti da immunizzare nelle coorti dell'obbligo e diminuiscono i costi complessivi per la vaccinazione<sup>237,238</sup>. Tuttavia, nel 2005 il vaccino Hexavac, dopo che erano state distribuite circa 10 milioni di dosi in tutto il mondo e utilizzato per l'immunizzazione di circa il 50% delle coorti di bambini italiani nati nel 2003-2004 (circa 1.2 milioni di bambini), è stato sospeso dal commercio perché ritenuto responsabile di indurre una risposta anticorpale subottimale contro l'epatite B<sup>303,304</sup>. Dalla sospensione è iniziato un programma di sorveglianza da parte della ditta produttrice per verificarne l'immunogenicità a lungo termine<sup>381</sup>, di cui lo *Studio 2* del presente lavoro di tesi costituisce una tappa. Si è trattato di un trial clinico di fase III, aperto, multicentrico e controllato in due coorti di pre-adolescenti sani con documentata storia vaccinale corrispondente a 3 dosi di vaccino esavalente Hexavac o Infanrix Hexa, somministrate nel primo anno di vita (ai tempi 3, 5 e 11 mesi), per determinare, a seguito di una dose challenge di vaccino monovalente anti-epatite B, la percentuale di soggetti che risultano protetti nei confronti di HBV, dopo 10 anni dall'immunizzazione primaria. I risultati di questo studio hanno dimostrato che all'inizio dell'adolescenza oltre l'80% dei soggetti vaccinati con vaccini esavalenti presentava titolo anticorpale protettivo o memoria immunologica nei confronti del virus.

Considerando però la persistenza in circolo degli anticorpi anti-HBs a 10 anni di distanza dalla serie vaccinale primaria, solo il 44.7% dei soggetti inclusi nello studio aveva titolo anticorpale protettivo ( $\geq 10$  UI/l) pre-challenge; in particolare, la proporzione di soggetti con anti-HBs  $\geq 10$  UI/l ed i valori di GMC erano significativamente inferiori tra i vaccinati con Hexavac rispetto agli immunizzati con Infanrix Hexa (rispettivamente 24.0% vs 69.0% e 7.7 UI/l vs 26.8 UI/l).

La risposta anticorpale subottimale nei confronti della componente antigenica anti-epatite B del vaccino Hexavac rispetto ad Infanrix Hexa era già stata osservata subito dopo l'introduzione in commercio dei due esavalenti, tanto da rendere necessaria la sospensione dal mercato di Hexavac. In particolare, studi multicentrici, randomizzati e controllati sono stati effettuati in diversi Paesi europei dopo circa un mese dal completamento della serie di immunizzazione primaria con i due esavalenti: in Germania, a seguito di 3 dosi di vaccino Hexavac o Infanrix Hexa (ai tempi 2, 4, 6 mesi di vita), *Tichmann et al.* avevano rilevato una quota di sieroprotetti, sia in termini di proporzione di anticorpi anti-HBs  $\geq 10$  UI/l (94.7%) sia in termini di GMC (226.4 UI/l), significativamente inferiore tra i vaccinati con Hexavac rispetto ai corrispettivi valori ottenuti tra gli immunizzati con Infanrix Hexa (anti-HBs  $\geq 10$  = 98.6% e GMC = 905.6 UI/l)<sup>299</sup>; in coorti di vaccinati con i due esavalenti in Italia, Finlandia e Svezia secondo le schedule vaccinali nazionali dei singoli Paesi, *Kilpi et al.* avevano mostrato che l'immunogenicità di Infanrix Hexa era significativamente superiore a quella di Hexavac (GMCR Hexavac/Infanrix Hexa pari a 0.21) con valore di GMC indotta dal primo vaccino oltre 4 volte

superiore rispetto al secondo<sup>301</sup>. Anche studi condotti separatamente sull'uno e sull'altro vaccino rispecchiavano la stessa tendenza: l'AIFA, su dichiarazioni dell'EMA, indicava che il vaccino Hexavac doveva essere sospeso dal commercio poiché a distanza di un mese dalla terza dose del ciclo vaccinale primario, nonostante oltre il 95% dei bambini vaccinati presentava titoli anticorpali  $\geq 10$  UI/l, una quota variabile dal 5 al 20% degli immunizzati superava di poco tale soglia protettiva con anti-HBs  $< 100$  UI/l<sup>304</sup>, valore considerato in diversi studi come la concentrazione minima di anticorpi da sviluppare a seguito di immunizzazione primaria per garantire una protezione a lungo termine<sup>278-281</sup>. In Francia, *Mallet et al.* avevano riportato sieroprotezione e sieroconversione per tutti gli antigeni contenuti nel vaccino Hexavac superiore al 90% un mese dopo la terza dose, ma mettendo a confronto la componente antigenica anti-epatite B del vaccino esavalente con il corrispettivo vaccino monovalente la percentuale di anti-HBs  $\geq 10$  UI/l e i valori di GMC erano significativamente inferiori per i vaccinati con l'esavalente rispetto al monovalente (96.6% vs 100% e 434 UI/l vs 983 UI/l)<sup>297</sup>; infine in Francia ed in Germania, *Olivier et al.* avevano osservato tassi di sieroconversione in anti-HBs e valori di GMC inferiori all'atteso in bambini a cui l'Hexavac era stato somministrato contemporaneamente a Prevenar (vaccino antipneumococcico eptavalente, coniugato) o NeisVac-C (vaccino antimeningococco di tipo C, coniugato)<sup>300</sup>. Elevati tassi di sieroprotezione e GMC contro HBV venivano invece riportati per il vaccino Infanrix Hexa senza nessuna differenza statisticamente significativa rispetto alle corrispettive composizione vaccinali anti-epatite B monovalenti; pertanto, nessun provvedimento è stato intrapreso nei confronti di quest'ultimo vaccino<sup>242,244,302</sup>.

Successivi studi condotti per valutare l'immunogenicità a lungo termine dei vaccini esavalenti hanno confermato la tendenza. Già a distanza di soli 15 mesi dalla terza dose di vaccino esavalente (Hexavac o Infanrix Hexa) del ciclo vaccinale primario (3 dosi a 3, 5, 12 mesi di vita), in un piccolo studio condotto nel nord Italia emergeva una differenza statisticamente significativa della proporzione di sieroprotetti e delle GMC tra le due coorti in studio, a sfavore del vaccino Hexavac (coorte Hexavac: anti-HBs  $\geq 10$  UI/l 69% e GMC 27.6 UI/l vs coorte Infanrix Hexa: anti-HBs  $\geq 10$  UI/l 96% e GMC 332.2 UI/l)<sup>382</sup>. Dopo una media di 2 anni e mezzo dall'immunizzazione primaria con i due vaccini esavalenti (4 dosi di Hexavac o Infanrix Hexa ai tempi 2, 3, 4 e 11-14 mesi di vita), in uno studio di sorveglianza nazionale sull'efficacia a lungo termine della vaccinazione anti-epatite B condotto in Germania è stato osservato che la percentuale di individui con anti-HBs inferiori alla soglia protettiva era significativamente più elevata tra soggetti immunizzati con Hexavac rispetto a quelli vaccinati con Infanrix Hexa (25.3% vs 4.7%)<sup>383</sup>. Infine, in due studi multicentrici, randomizzati e controllati, condotti sul territorio italiano, con organizzazione simile all'attuale *Studio 2* ma effettuati a 5 anni di distanza dal ciclo vaccinale primario, è stato sottolineato che solo il 40% circa dei soggetti nella coorte Hexavac mentre oltre l'80% degli arruolati nella coorte Infanrix Hexa aveva una concentrazione anticorpale protettiva, con differenza statisticamente significativa tra i due gruppi; uguale tendenza è stata osservata considerando le GMC delle due coorti di entrambi i trial<sup>347,375</sup>. Seppur sia nello *Studio 2* del presente lavoro di tesi sia negli altri studi condotti per valutare l'immunogenicità a lungo termine dei vaccini esavalenti non si conosce l'esatta concentrazione di anticorpi anti-HBs a seguito della serie vaccinale primaria, l'andamento complessivo dei risultati ottenuti nel corso del tempo sottolinea ancora una volta come la persistenza in circolo degli anticorpi anti-HBs diminuisce con il passare degli anni dal ciclo vaccinale primario e tale declino sembra proprio essere correlato al picco



anticorpale raggiunto in seguito all'immunizzazione primaria. Importante risulta dunque la persistenza dell'immunità cellulare indotta da vaccino.

In seguito alla somministrazione di una dose challenge di vaccino anti-epatite B, gli studi condotti fino a 5 anni di distanza dall'immunizzazione primaria con i due esavalenti hanno riscontrato una simile ed ottimale risposta anamnestiche tra i vaccinati con Hexavac e quelli con Infanrix Hexa,<sup>347,375,382,383</sup> inoltre è stata addirittura dimostrata in vitro una forte e comparabile risposta B e T cellulare<sup>286,384</sup>. Nello *Studio 2* di questo lavoro di tesi emergono invece dei nuovi dati interessanti. Coerentemente ai risultati pre-challenge, l'effetto post-challenge osservato a 10 anni di distanza dalla serie vaccinale primaria è risultato significativamente superiore tra i pre-adolescenti vaccinati nel primo anno di vita con Infanrix Hexa rispetto a quelli immunizzati con Hexavac; infatti la percentuale di soggetti che presentavano concentrazione di anti-HBs  $\geq 10$  UI/l nei due gruppi era rispettivamente pari a 96.4% e 83.6%. La stessa tendenza è stata riscontrata per le GCM ed il GMCR che rispettivamente risultavano circa 10 volte e 2.7 volte superiori nella coorte Infanrix Hexa rispetto alla coorte Hexavac (1823.8 UI/l vs 191.9 UI/l e 68.1 vs 25.2). Degni di nota sono però i risultati ottenuti confrontando il titolo anticorpale post-challenge in relazione alla concentrazione pre-challenge che mettono in evidenza come la percentuale di pre-adolescenti con anti-HBs pre-challenge  $< 10$  UI/l che hanno mostrato una risposta anamnestiche post-challenge era lievemente più bassa nella coorte Hexavac (78.4%) rispetto alla coorte Infanrix Hexa (88.5%), ma tra le proporzioni dei due gruppi non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa.

Attualmente, non sono presenti in letteratura altri studi che mettono a confronto i due vaccini esavalenti a 10 anni di distanza dal ciclo vaccinale primario, né studi che valutano la persistenza di sieroprotezione per i vaccinati con Hexavac dopo la prima decade dall'immunizzazione primaria. Un recente studio condotto in Slovacchia ha valutato la persistenza di immunità umorale e cellulare del vaccino Infanrix Hexa a distanza di 10-11 anni dalla serie di immunizzazione primaria (3 dosi a 3, 5, 11 mesi di vita) riportando valori di sieroprotezione comparabili alle composizioni vaccinali anti-epatite B monovalenti, poiché, seppur circa il 50% dei vaccinati con Infanrix Hexa non presentava titolo anticorpale protettivo, a seguito di somministrazione di una dose challenge di vaccino monovalente anti-HBV più del 90% dei non protetti pre-challenge ha dimostrato una risposta anamnestiche post-challenge, con anti-HBs  $\geq 10$  UI/l<sup>385</sup>.

Un limite dello *Studio 2* di questo lavoro di tesi consiste nel fatto che non conoscendo il titolo anticorpale a seguito dell'immunizzazione primaria, non è neppure possibile stabilire con certezza se i soggetti con anti-HBs  $< 10$  UI/l a distanza di 10 anni dal ciclo vaccinale primario erano fin dal principio dei non-responders o degli ipo-responders alla vaccinazione anti-epatite B oppure se la mancata risposta anamnestiche è la conseguenza di una scarsa immunogenicità a lungo termine dei vaccini esavalenti. Tuttavia, considerando complessivamente i risultati attuali con quelli raccolti a 5 anni di distanza dal ciclo vaccinale primario in studi condotti nella stessa area geografica e con una metodologia simile all'attuale trial clinico si osserva che la proporzione di soggetti che non hanno risposto al challenge è aumentata con il passare del tempo<sup>347,375</sup>. Di conseguenza, ad oggi, l'ipotesi che una certa quota di pre-adolescenti (21.6% nella coorte Hexavac e 11.5% nella coorte Infanrix Hexa) con anti-HBs pre-challenge al di sotto della soglia protettiva potrebbe aver perso la memoria immunologica 10 anni dopo l'immunizzazione primaria sembra essere la motivazione più plausibile,

in quanto a seguito di stimolazione antigenica mediante somministrazione di una dose challenge di vaccino monovalente anti-epatite B non hanno mostrato un'adeguata risposta anamnestic. Dunque, è altrettanto ragionevole aspettarsi che la proporzione di soggetti incapaci di mostrare risposta anamnestic post-challenge possa aumentare ulteriormente durante la seconda decade dall'immunizzazione primaria parallelamente all'aumentare dei rischi di esposizione all'agente patogeno. Questo potrebbe non solo esporre i soggetti ad un maggior rischio di contrarre l'infezione, ma andrebbe anche a compromettere l'efficacia della strategia vaccinale anti-epatite B nel nostro Paese.

Una questione ancora aperta che richiede ulteriori approfondimenti consiste nel fatto di capire se gli individui che non sono in grado di innescare una risposta anamnestic post-challenge possano essere realmente vulnerabili all'infezione da HBV. L'assenza di una risposta secondaria ad una dose challenge di vaccino anti-epatite B non necessariamente implica che questi soggetti non siano protetti e quindi risultino esposti al rischio di contrarre l'infezione con manifestazione clinica della malattia ed eventuale sviluppo dello stato di portatore cronico; studi futuri saranno pertanto necessari per meglio chiarire la questione. In linea con questo assunto, alcuni studi sull'immunogenicità a lungo termine della vaccinazione anti-epatite B condotti in Alaska e Gambia, aree ad elevata endemia per HBV prima dell'introduzione del programma di immunizzazione universale per l'infanzia, documentano che la sieroconversione ad anti-HBc in assenza di altri segni clinici di infezione (malattia acuta o stato di portatore cronico) possono verificarsi anche tra soggetti correttamente vaccinati<sup>288,289</sup>.

Nello *Studio 2* del presente lavoro di tesi è stata rilevata una quota (10 soggetti pari a 1.3%) di soggetti anti-HBc positivi (6 soggetti nella coorte Hexavac e 4 soggetti nella coorte Infanrix Hexa) senza però presentare nessun altro marcatore di infezione (HBsAg e HBV-DNA negativi). L'assenza di dati sierologici prima del ciclo vaccinale primario e nel periodo intercorso dall'immunizzazione primaria al momento dello studio non ci permette di stabilire con certezza quando è stata acquisita l'infezione. Tuttavia, dal momento che tutti i pre-adolescenti in studio erano nati da madre HBsAg negativa è più probabile pensare che il contatto con il virus sia avvenuto a seguito dell'immunizzazione. Poiché la relazione tra sintomatologia e severità della malattia è inversamente correlata all'età di acquisizione dell'infezione, nel presente studio è possibile dedurre che la vaccinazione anti-epatite B abbia aiutato almeno parzialmente a proteggere gli individui esposti ad HBV, i quali pur essendo stati infettati dal virus hanno presentato solo un'infezione transitoria e benigna senza diventare dei portatori cronici. Va infine riportato che 2 dei 10 pre-adolescenti anti-HBc positivi (entrambi nella coorte Hexavac) avevano titolo anticorpale non protettivo sia prima sia dopo la somministrazione del challenge nonostante la presunta esposizione al virus. Come già spiegato precedentemente, la presenza di positività solo per anti-HBc in assenza di malattia clinica può essere la conseguenza di risultati falsi positivi al test (evento non raro specialmente in popolazioni a bassa endemia), infezioni occulte da HBV in presenza di HBV DNA al di sotto del limite di rilevazione degli attuali metodi commerciali di amplificazione genomica, infezioni naturali risolte con declino di anti-HBs. Non è possibile trarre conclusioni certe per questi due casi e studi futuri sono necessari per monitorare l'epidemiologia dell'infezione da HBV nel nostro Paese verificando l'effettiva efficacia a lungo termine del programma di vaccinazione anti-epatite B con vaccini esavalenti.

Nello *Studio 2* del presente lavoro di tesi è stato anche valutato il profilo di sicurezza del vaccino HBVAXPRO, impiegato come challenge in questo trial. Circa la metà dei soggetti in esame (46.1%) ha riportato almeno un evento avverso nei 14 giorni successivi alla somministrazione del vaccino ed il 41.3% delle reazioni avverse registrate sono risultate vaccino-correlate. La maggior parte degli eventi avversi si sono verificati a livello del sito di iniezione (40.7%) nei 4 giorni successivi all'inoculazione. Tutti gli eventi avversi a livello del sito di iniezione del vaccino sono stati considerati correlati al vaccino stesso. Si è trattato principalmente di reazioni avverse sollecitate (40.5%) e di lieve entità, tra cui la frequenza maggiore è rappresentata da dolore a livello del sito di inoculo (39.3%). Solo una limitata proporzione di individui in studio (11.7%) ha manifestato reazioni avverse sistemiche nei 14 giorni post-iniezione, di cui solo l'1.9% è stato considerato vaccino-correlato. Non si sono verificati decessi e nessun soggetto è stato escluso dallo studio per insorgenza di eventi avversi gravi. Tuttavia due reazioni avverse severe sono state riportate da 2 soggetti durante il periodo dello studio, si è trattato di un caso di Schwannoma alla gamba sinistra e di un caso di sclerosi multipla. Non sono noti in letteratura casi di Schwannoma in relazione alla vaccinazione anti-epatite B, mentre dibattuta è la possibile relazione tra sclerosi multipla e vaccinazione. La sclerosi multipla è una malattia cronica la cui eziologia non è stata tutt'oggi chiarita, anche se la presunta causa sembra essere la demielinizzazione del sistema nervoso centrale mediata dal sistema immunitario; da questo assunto nasce la speculazione di alcuni autori sulla possibile relazione tra la patologia e le vaccinazioni. Ad oggi, nessuno studio ha realmente dimostrato una relazione causale tra insorgenza di sclerosi multipla e vaccinazione anti-epatite B. Due studi presenti in letteratura osservano un aumento del rischio di sviluppare sclerosi multipla a seguito di immunizzazione con vaccino anti-epatite B<sup>256,386</sup>. Un ulteriore studio identifica questo rischio solo parzialmente, per un sottogruppo della popolazione in esame<sup>258</sup>. Altri due studi descrivono un rischio di ricaduta a seguito di vaccino anti-HBV, ma anche in questo caso nessuna reale associazione è stata dimostrata<sup>254,387</sup>. La maggior parte degli studi pubblicati non rileva nessuna associazione tra la somministrazione del vaccino anti-epatite B e l'insorgenza della malattia<sup>251-253,388-390</sup>. In un recente studio pubblicato da *Langer-Gould et al.* sono stati analizzati tutti i casi di sclerosi multipla e sindrome da demielinizzazione del sistema nervoso centrale rilevati in California tra il 2008 ed il 2011 per verificare possibili associazioni alle vaccinazioni anti-epatite B ed anti-papilloma. Gli autori di questo studio evidenziano che nessun effetto negativo a lungo termine vaccino-correlato è stato identificato nel periodo in esame e nessuna associazione tra vaccinazione ed insorgenza di malattie demielinizzanti è stata individuata nei trenta giorni successivi alla somministrazione di vaccino nei soggetti più giovani. Da questo studio emerge inoltre che il vaccino non sembra essere causa dell'insorgenza della malattia, ma come avviene per alcune infezioni virali, potrebbe solo accelerare un processo autoimmune subclinico già in atto. Rassicurante e di notevole rilievo è infine l'osservazione che nessuna associazione tra aumento del rischio di sclerosi multipla o di malattia demielinizzante e vaccinazione anti-epatite B è stata identificata a tre anni di distanza dall'immunizzazione<sup>391</sup>. Nell'attuale *Studio 2*, nessuno dei due eventi avversi gravi è stato correlato alla somministrazione del vaccino. Complessivamente i risultati di questo studio rispecchiano quanto già osservato in studi precedenti in cui è stato valutato il profilo di sicurezza del vaccino HBVAXPRO e quindi questo vaccino monovalente anti-epatite B si rivela ben tollerato<sup>347,375,382,392</sup>.

In conclusione, l'immunogenicità sub-ottimale del vaccino esavalente Hexavac rispetto al vaccino Infanrix Hexa nei confronti della componente antigenica anti-epatite B è stata dimostrata già dopo pochi anni dall'introduzione in commercio dei due esavalenti, tanto da determinarne nel giro di cinque anni la sua sospensione. Il motivo della ridotta immunogenicità del vaccino esavalente Hexavac rispetto al vaccino Infanrix Hexa non è però ancora stata chiarita. L'EMA identifica come motivo primario della risposta sub-ottimale di tale vaccino nei confronti della componente antigenica anti-epatite B una modifica nel processo di produzione<sup>303</sup>. Tuttavia la differenza potrebbe essere legata alla minore quantità di antigene contenuto nelle due composizioni vaccinali (5 µg vs 10 µg). Dallo *Studio 2* del presente lavoro di tesi si evince che a distanza di 10 anni dall'immunizzazione primaria la risposta umorale e cellulare del vaccino Hexavac è effettivamente inferiore rispetto a quella del vaccino Infanrix Hexa, ma per entrambe le composizioni vaccinali sembra aumentare progressivamente nel tempo la quota di soggetti in cui la memoria immunologica indotta da vaccino tende a svanire. Tuttavia, il reale significato della perdita di memoria immunologica in relazione alla possibilità di diventare nuovamente suscettibili all'infezioni da HBV e quindi l'eventuale necessità di un nuovo ciclo vaccinale primario per garantire la protezione nei confronti dell'agente patogeno sono questioni che dovranno essere approfondite e chiarite con studi futuri. Un continuo monitoraggio dell'immunogenicità a lungo termine dei vaccini esavalenti risulta certamente necessario per garantire l'efficacia delle strategie di vaccinazione anti-epatite B nel nostro Paese ed a livello globale.

L'introduzione della vaccinazione universale anti-epatite B per l'infanzia ha cambiato notevolmente il quadro epidemiologico dell'infezione da HBV nella maggior parte dei Paesi del mondo. In Italia, la vaccinazione anti-epatite B, iniziata nel 1983 su base regionale per i soli gruppi a rischio di contrarre l'infezione e divenuta obbligatoria nel 1991 per tutti i nuovi nati e, fino al 2003, anche per i dodicenni, ha drasticamente ridotto l'incidenza delle infezioni acute e la prevalenza dei marcatori di infezione su tutto il territorio nazionale<sup>204,331-335</sup>. I primi dati epidemiologici italiani attualmente disponibili risalgono al 1985, in cui veniva registrato un tasso annuo di incidenza dell'infezione da HBV pari a 12 casi per 100,000 abitanti e vedeva la fascia d'età 15-24 anni maggiormente esposta al rischio di contrarre l'infezione con una frequenza di 41 casi per 100,000 abitanti. Fino all'introduzione dell'immunizzazione universale anti-epatite B, nel nostro Paese l'incidenza dell'infezione, seppur progressivamente in riduzione, ha mantenuto valori piuttosto elevati con 5 casi per 100,000 abitanti registrati nel 1990 nell'intera popolazione nazionale e 17 casi per 100,000 abitanti per la classe d'età 15-24 anni<sup>204</sup>. Nel nostro Paese, la vaccinazione universale anti-epatite B per l'infanzia e per i dodicenni mirava a proteggere, nel giro di 12 anni, le classi d'età maggiormente a rischio di contagio e cronicizzazione (0-24 anni)<sup>393</sup>. Dall'inizio della strategia di immunizzazione universale è stato evidenziato un notevole decremento dell'incidenza di epatite B, poiché da valori di 5 casi per 100,000 abitanti nel 1991 (1 caso nel sottogruppo 0-14 anni, 12 casi tra 15-24 anni e 4 casi per i soggetti di età  $\geq 25$  anni) si è arrivati a 0.6 casi per 100,000 abitanti nel 2015 (di cui 0.1 caso tra 0-14 anni, 0.3 casi tra 15-24 anni e 0.8 casi per i  $\geq 25$  anni)<sup>204</sup>. Oltre ad un monitoraggio complessivo della frequenza di nuove infezioni da HBV, per valutare l'effettiva efficacia del programma italiano di vaccinazione universale anti-epatite B è importante effettuare una più approfondita analisi dei casi di epatite B acuta sul territorio nazionale per capire se tali infezioni si verificano tra soggetti vaccinati o non vaccinati e più in dettaglio se si tratta di individui opportunamente vaccinati secondo la schedula

vaccinale nazionale. Quest'analisi permette di indagare gli eventuali motivi del fallimento vaccinale e stimare la quota di infezioni che si sarebbe potuta evitare se fosse stata rispettata, in termini di tempo e di dosi, la schedula vaccinale prevista in Italia per l'immunizzazione anti-epatite B. A questo proposito è stato condotto lo *Studio 3* del presente lavoro di tesi di dottorato, in cui avvalendosi dell'importantissimo database del sistema di sorveglianza e raccolta dati epidemiologici nazionali sulle epatiti virali, il SEIEVA, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità, sono stati analizzati i casi di epatite B acuta e gli eventuali fattori di rischio associati a tale infezione virale nel periodo 1993-2014 in Italia.

Nei 22 anni successivi all'implementazione della vaccinazione universale anti-epatite B, nel nostro Paese, 11,311 casi di epatite B acuta, con informazioni chiare ed univoche sullo stato vaccinale di ciascun individuo, sono stati segnalati al SEIEVA. L'età mediana della popolazione arruolata è risultata pari a 36 anni ed è andata significativamente aumentando con il passare del tempo, da 26 anni nel 1993 a 46 anni nel 2014 ( $p < 0.001$ ), indice dell'efficienza della vaccinazione anti-epatite B nel proteggere le fasce d'età immunizzate che dal 1993, in cui le coorti protette erano solo i soggetti di 0-2 anni e 12-13 anni, si è arrivati nel 2014 ad una protezione nella coorte 0-34 anni. Inoltre, dall'analisi emerge che nel periodo post-immunizzazione universale anti-epatite B, in Italia, la maggior parte dei casi di epatite B acuta ha coinvolto individui non vaccinati (96.8%), mentre solo una piccola quota di soggetti (3.2%) presentava l'infezione nonostante la somministrazione di almeno una dose di vaccino anti-epatite B; tale percentuale si riduce ulteriormente se si considerano i soli soggetti con ciclo vaccinale primario completato correttamente come misura profilattica pre-esposizione al virus.

Tra i soggetti non vaccinati, va ricordata la presenza di casi di epatite B acuta in individui appartenenti a gruppi a maggior rischio di esposizione all'agente patogeno per i quali l'immunizzazione anti-epatite B è raccomandata e gratuita, o addirittura appartenenti alla coorte dell'obbligo vaccinale. Nonostante per la maggior parte del periodo in studio, a livello nazionale sono stati mantenuti adeguati tassi di copertura vaccinale ( $\geq 95\%$ ), una quota di casi di epatite B (213 o 1.9%) si è verificata tra soggetti sfuggiti all'immunizzazione anti-epatite B obbligatoria. La maggior parte di questi casi erano adolescenti (87.8%) provenienti principalmente da regioni del sud Italia. Questa ristretta quota di casi sfuggiti all'immunizzazione universale anti-epatite B è indice di situazioni di elevato e grave degrado sociale che rendono difficile il controllo della situazione sanitaria locale. Maggiori sforzi, che vanno ben oltre alla sola vaccinazione anti-epatite B, sarebbero necessari per migliorare le condizioni socio-sanitarie di tali aree. Inoltre, nello *Studio 3*, nel 25.8% ( $n=2,821$ ) dei casi non vaccinati l'epatite B acuta è stata diagnosticata in individui ad elevato rischio di esposizione al virus che non avevano ricevuto la vaccinazione anti-epatite B, seppur raccomandata e gratuita. Questo sottolinea ancora una volta l'importanza di campagne di sensibilizzazione ed educazione sanitaria sia per i soggetti a maggior rischio di esposizione, sia per l'intera popolazione al fine di aumentare la consapevolezza del rischio di esposizione al virus e di aumentare la conoscenza delle norme preventive da adottare per evitare un possibile contagio, tra cui la vaccinazione. Considerando complessivamente la quota di coloro che sono sfuggiti alla vaccinazione obbligatoria e quelli che non sono stati vaccinati seppur a maggior rischio di contagio, si stima che l'infezione da HBV poteva essere evitata nel 27.7% dei non vaccinati (3,034 di 10,949), e conseguentemente nel 26.8% del totale dei casi in studio (3,034 di 11,311). Tuttavia, un dato positivo è che la tendenza di casi tra i non immunizzati ha mostrato una diminuzione annua significativa (150-250 casi/anno nel

1993-2001 vs. 40-60 casi/anno nel 2010-2014;  $p < 0.001$ ) attribuibile ad un aumento nella proporzione di soggetti vaccinati e forse un aumento dell'effetto di immunità di gregge.

In questo studio, l'uso di droghe per via iniettiva, la convivenza con portatore cronico di HBsAg ed i rapporti sessuali non protetti tra omosessuali o bisessuali si sono rivelati i principali fattori di rischio associati all'infezione acuta da HBV tra i soggetti non vaccinati. Un risultato allarmante è però la significativa quota di tossicodipendenti con epatite B acuta non vaccinati, seppur afferenti a centri di recupero già prima della diagnosi di infezione (circa 13%); inoltre, quasi il 37% dei conviventi di portatori cronici di HBsAg che hanno sviluppato epatite B acuta, non erano vaccinati seppur consci dello stato infettivo del proprio convivente. Per quest'ultimo gruppo, i dati raccolti mediante specifico questionario hanno mostrato che i principali motivi di rifiuto dell'immunizzazione anti-epatite B sono stati la mancanza di fiducia, l'attitudine negativa o le errate convinzioni nei confronti della vaccinazione (67.7%), seguita da mancata o insufficiente comunicazione (10.5%) e scarsa percezione della severità della malattia (8.8%). La mancanza di fiducia nei confronti delle vaccinazioni è purtroppo una triste tendenza che dal 2013 si sta verificando in tutta la popolazione italiana poiché, dai dati pubblicati dal Ministero della Salute, nell'ultimo triennio (2013-2015) si è registrato un progressivo calo generale delle coperture vaccinali pediatriche tra cui quelle inerenti l'immunizzazione anti-epatite B (3 dosi di vaccino entro il primo anno di vita ai tempi 3, 5 e 11-12 mesi). Mentre dal 2002 al 2012 si assisteva a valori di copertura vaccinale pediatrica anti-epatite B al di sopra della soglia protettiva (95%) raccomandata dal WHO per la cosiddetta immunità di gregge, con raggiungimento nel 2007 della percentuale più elevata pari a 96.5%, a partire dal 2013 si sta registrando un cambiamento di tendenza con tassi di copertura vaccinale che sono progressivamente scesi a 95.5%, 94.6% nel 2014 ed infine, l'ultimo dato ad oggi disponibile, 93.2% nel 2015<sup>349</sup>. Questo decremento delle coperture vaccinali è rischioso per tutta la collettività poiché porta all'accumulo di un numero crescente di soggetti suscettibili che, per infezioni attualmente sotto controllo, potrebbe tradursi nel rischio di focolai epidemici di grosse dimensioni. Questo campanello d'allarme deve farci riflettere sul fatto che è necessario evitare la diffusione di errate convinzioni sulle vaccinazioni e dunque, al fine di aumentare la fiducia e l'adesione all'immunizzazione da parte di tutta la popolazione, sono fondamentali maggiori sforzi ed un'adeguata informazione da parte di medici, personale sanitario ed operatori di sanità pubblica nel trasmettere ai propri assistiti ed a livello sociale l'importanza e l'efficacia della vaccinazione come strumento per proteggere sia il singolo individuo sia l'intera comunità nei confronti di quelle infezioni vaccino-prevenibili le cui complicanze possono essere severe e letali, come lo è per l'epatite B.

Dal 1993 al 2014, tra gli 11,311 casi di epatite B acuta segnalati al SEIEVA ed arruolati per questo studio, solo 3.2% ( $n=362$ ) erano soggetti che avevano ricevuto almeno una dose di vaccino anti-epatite B. Informazioni complete sullo stato vaccinale erano disponibili per 277 di 362 (76.5%) individui vaccinati, mostrando che solo 50 casi dei 277 (18.1%) avevano ricevuto un ciclo vaccinale primario completo secondo i tempi e le dosi previste dalla schedula vaccinale nazionale anti-epatite B e prima di un'eventuale esposizione all'agente patogeno. Ricalcolando il 18.1% sul totale dei 362 casi ricevuti almeno una dose di vaccino anti-epatite B risulta una stima di 66 infezioni da HBV in individui opportunamente immunizzati pre-esposizione al virus e segnalati al SEIEVA nei 22 anni successivi all'implementazione della vaccinazione universale anti-epatite B in Italia. Di conseguenza, tra il 1993 ed il 2014, la frequenza complessiva di infezioni acute da HBV in soggetti opportunamente

vaccinati risulta di circa 0.6% (66/11,311). Inoltre, considerando che durante il periodo di sorveglianza in studio, il SEIEVA ricopriva circa il 60% della popolazione nazionale, è possibile stimare che annualmente in Italia si siano verificati 5 fallimenti vaccinali. Questo indica chiaramente che nel nostro Paese le nuove infezioni da HBV in soggetti opportunamente vaccinati sono un evento raro, considerando che i soggetti immunizzati sono un terzo dell'intera popolazione nazionale ovvero circa 20 milioni di individui. In questo contesto, è possibile speculare che l'immunità di gregge raggiunta a seguito dell'immunizzazione di un ampio numero di individui potrebbe aver svolto un ruolo cruciale nel controllo e nella prevenzione dell'infezione causata dal virus dell'epatite B. Questo sottolinea ancora una volta quanto sia fondamentale mantenere elevati tassi di copertura vaccinali tali da raggiungere e superare la soglia minima per la cosiddetta immunità di gregge che offre protezione non solo per il singolo individuo, ma anche e soprattutto per la collettività.

Dai risultati di questo studio emerge inoltre che tra i 277 individui con informazioni complete sullo stato vaccinale, 76 soggetti (27.4%) avevano infezione acuta da HBV a seguito di un'errata somministrazione del vaccino anti-epatite B in termini di dosi ( $n=40$ ,  $<3$  dosi) o tempi ( $n=36$ ). Ricalcolando il 27.4% sul totale dei 362 casi ricevuti almeno una dose di vaccino anti-epatite B risulta una stima di circa 99 infezioni da HBV insorte a seguito di un'errata schedula vaccinale del ciclo di immunizzazione primario pre-esposizione, pari quindi allo 0.9% dei casi totali arruolati (99/11,311) che si sarebbero potuti evitare tra il 1993 ed il 2014 se fosse stata rispettata la schedula vaccinale nazionale raccomandata per l'immunizzazione anti-epatite B. È dunque altrettanto opportuno precisare che, per avere un'adeguata protezione individuale nei confronti dell'agente patogeno ed andare ad incrementare la cosiddetta immunità di gregge per una protezione collettiva e quindi un controllo dell'infezione, occorre non solo l'esecuzione della vaccinazione anti-epatite B, ma soprattutto la somministrazione del vaccino come misura profilattica pre-esposizione eseguita secondo le dosi ed i tempi raccomandati dalla schedula vaccinale nazionale, ovvero 3 dosi di vaccino anti-HBV somministrate a 3, 5 e 11 mesi di vita per i neonati ed ai tempi 0, 1, 6 mesi per bambini, adolescenti ed adulti.

Dal confronto tra le informazioni raccolte dai casi opportunamente vaccinati e dai casi non immunizzati, è emerso che il primo gruppo rispetto al secondo era costituito da individui più giovani, meno frequentemente ospedalizzati e con valori di ALT significativamente inferiori. Questo potrebbe suggerire che la vaccinazione anti-epatite B abbia avuto un qualche effetto nel rallentare il corso naturale della malattia; tuttavia questa interpretazione dei risultati necessita ulteriori conferme ed approfondimenti. Tra i soggetti opportunamente vaccinati i principali fattori di rischio sono risultati la tossicodipendenza e la convivenza con portatore cronico di HBsAg; anche il significato di queste associazioni necessita però di ulteriori chiarimenti.

La caratterizzazione molecolare dei ceppi virali infettanti i casi opportunamente vaccinati ( $n=50$ ) ha permesso di rilevare la presenza di HBV-DNA in 13 dei 17 individui di cui era disponibile un campione di siero per l'esecuzione dei test virologici. Per i 4 soggetti per i quali non è stato rilevato l'acido nucleico virale, è possibile ipotizzare che il risultato negativo dipenda dal fatto che il prelievo sia stato effettuato solo nelle fasi finali di infezione acuta da HBV, quando la carica virale si sta negativizzando.

Nonostante il numero ridotto dei casi indagati, la maggior parte risultava infetta da genotipo F (38.4%), seguita da genotipo D (30.8) ed A (15.4%), mentre una piccola ed uguale quota presentava genotipo B ed E (7.7%). I genotipi di HBV hanno una distribuzione geografica eterogenea e generalmente in ogni area vi è un genotipo predominante: il genotipo A è ampiamente diffuso in Africa nord-occidentale, nell'Europa settentrionale e negli Stati Uniti d'America; il genotipo B si trova in Asia orientale; il genotipo D è prevalente nei Paesi europei del bacino del Mediterraneo, ma è presente anche in Africa e soprattutto in India; il genotipo E è endemico in Africa centro-occidentale e difficilmente si trova in altri Paesi, fatta eccezione per soggetti di origine africana; il genotipo F rappresenta il ceppo virale di HBV più diffuso nell'America centro-meridionale ed in Alaska<sup>69,103-106</sup>. Tuttavia genotipi diversi possono co-circolare nello stesso territorio in quanto la loro distribuzione globale è influenzata anche da etnicità e flussi migratori. Complessivamente l'eterogeneità genotipica osservata in questo studio rispecchia quanto rilevato recentemente nel nostro Paese. Infatti, in generale in Italia, così come nel resto dei Paesi del bacino del Mediterraneo, il genotipo D risulta il ceppo virale predominante delle infezioni acute e croniche da HBV, ma negli ultimi 20 anni l'incremento dei flussi migratori ha notevolmente modificato l'epidemiologia dell'infezione da HBV rilevando un incremento delle infezioni sostenute da genotipi non-D<sup>394</sup>. In particolare, un maggior numero di casi sostenuti da genotipo A sono stati osservati nell'Italia meridionale<sup>395</sup>, ma anche infezioni da genotipo F sono già state descritte in letteratura nel nostro Paese<sup>396</sup>, a volte con una frequenza superiore all'atteso<sup>397,398</sup>.

Il fatto che 6 delle infezioni acute in vaccinati identificate in questo studio siano state sostenute da genotipo F (n=5) e genotipo E (n=1), entrambi genotipi non autoctoni in Italia, è però intrigante. È stato infatti riportato che la vaccinazione anti-epatite B, basata su ricombinanti di HBsAg ottenuti da ceppi di HBV di genotipo A e D (vaccini utilizzati attualmente a livello mondiale), potrebbe essere meno efficace proprio nei confronti dei genotipi F ed E in quanto questi genotipi presentano maggiori differenze a livello della sequenza amminoacidica del determinante  $\alpha$ , determinante antigenico comune a tutti i genotipi virali contro cui vengono prodotti anticorpi neutralizzanti a seguito di vaccinazione<sup>399</sup>. È però altrettanto importante ricordare che studi condotti in Alaska, dove è ampiamente diffuso il genotipo F, ed in Gambia, dove il genotipo E è predominante, la vaccinazione anti-epatite B si è rivelata estremamente efficace nel prevenire l'infezione e le sequele croniche ad essa correlate. Studi futuri saranno necessari per chiarire questa questione<sup>400,401</sup>.

Infine, l'analisi della sequenza amminoacidica corrispondente alla regione MHR di HBsAg dei 13 ceppi virali caratterizzati in questo studio, ha mostrato che 7 casi con epatite B acuta opportunamente vaccinati erano infetti da HBV wild-type, mentre in 6 casi era presente una variante virale potenzialmente in grado di eludere la risposta immunitaria indotta da vaccino. In particolare, dei 6 casi infetti da ceppi mutati, 3 individui non avevano un titolo anticorpale protettivo (anti-HBs <10 UI/l) nonostante la vaccinazione, mentre altri 3 risultavano sieroprotetti (anti-HBs ≥10 UI/l). Per i 3 soggetti anti-HBs <10 UI/l non è possibile trarre conclusioni, poiché non è noto il titolo anticorpale a seguito della serie vaccinale primaria e neppure la condizione immunitaria dei soggetti al momento dell'analisi, quindi non è possibile sapere se si trattava di non-responders alla vaccinazione anti-epatite B oppure di individui immunocompromessi e pertanto maggiormente suscettibili all'infezione. Per gli altri 3 soggetti invece la protezione conferita da vaccino sembrerebbe non essere



stata in grado di evitare l'infezione in quanto sostenuta da ceppi virali mutati. Le mutazioni identificate in questi tre soggetti erano: G145R, T118K e T126A.

G145R è stata la prima mutazione puntiforme individuata a livello del determinante  $\alpha$  in grado di alterare la conformazione della proteina HBsAg al punto di perdere le sue proprietà antigeniche e quindi essere in grado di eludere la risposta immunitaria a seguito di immunoprofilassi (*immune escape mutant*). È stato dimostrato che la mutazione G145R porta alla perdita di antigenicità di HBsAg poiché la glicina e l'arginina sono due amminoacidi di dimensioni differenti e con proprietà chimiche diverse tanto da alterare l'idrofobicità della proteina e da determinare la rottura della conformazione a doppio loop del determinante  $\alpha$  che pertanto non può più essere legato dagli anticorpi neutralizzanti anti-HBs diretti contro l'antigene wild type<sup>134</sup>. Tuttavia, è stato osservato che questa mutazione non comporta nessuna difficoltà di replicazione per il virus poiché non interessa la capacità di HBV di legarsi all'epatocita<sup>135,136</sup>. Inoltre, nonostante la mutazione, il virus mantiene inalterata la sua virulenza, come dimostrato precedentemente da esperimenti di infezione di scimpanzé inoculati con virus mutati<sup>137</sup>. La mutazione G145R è stata osservata per la prima volta in Italia, oltre 25 anni fa, in un bambino nato da madre HBsAg positiva al quale è stata diagnosticata un'infezione da HBV nonostante alla nascita avesse ricevuto profilassi attiva e passiva con conseguente sviluppo di un'adeguata risposta anticorpale anti-HBs<sup>128,129</sup>. Dalla sua individuazione, G145R è tra le più frequenti mutazioni rilevate in soggetti che sviluppano epatite B a seguito di somministrazione alla nascita di immunoglobuline e ciclo vaccinale primario, nonostante la presenza, in molti casi, di titolo anticorpale protettivo (anti-HBs  $\geq 10$  UI/l)<sup>130-133</sup>. La mutazione sembra però associata principalmente all'uso di immunoglobuline piuttosto che alla vaccinazione<sup>402,403</sup>. Alcuni studi hanno anche osservato che il mutante G145R viene identificato maggiormente nei genotipi B, C e D di HBV<sup>404</sup>. Nel presente studio il ceppo mutato G145R era di genotipo D, il soggetto infetto risultava sieroprotetto (anti-HBs  $\geq 10$  UI/l) in quanto immunizzato con un ciclo primario completo con vaccino anti-epatite B, senza però aver mai ricevuto profilassi passiva con immunoglobuline. Globalmente l'insorgenza di tale mutazione è comunque un evento raro ed attualmente non sembra costituire un problema per le strategie di immunizzazione anti-epatite B<sup>405-407</sup>.

Un'altra variante virale isolata nello *Studio 3* è stata T118K. Questa mutazione è stata recentemente osservata da *Hu et al.* in un bambino con infezione acuta da HBV nonostante la somministrazione di vaccino anti-epatite B secondo una corretta serie di immunizzazione primaria e titolo anticorpale protettivo<sup>408</sup>. In questo studio, sono state però identificate altre mutazioni a carico di HBV e quindi non è possibile sostenere con certezza che T118K sia la mutazione responsabile dell'alterazione della proteina HBsAg tanto da non essere più riconosciuta dagli anticorpi neutralizzanti anti-HBs indotti da vaccino. Di particolare interesse sono i risultati ottenuti precedentemente da *Kfoury Baz et al.* il quale, mediante l'impiego di un pannello di anticorpi monoclonali ed anticorpi indotti da vaccino, ha testato in vitro l'immunogenicità di HBsAg con mutazione T118K e P120Q rispetto alla proteina wild type: dagli esperimenti è emerso che anticorpi neutralizzanti indotti da vaccino presentano una minore reattività nei confronti di HBsAg mutato. Gli autori hanno ipotizzato che la presenza di tali mutazioni a carico di HBsAg potrebbero alterarne la conformazione originale diminuendo quindi la capacità degli anticorpi di riconoscere, legare e quindi neutralizzare l'antigene mutato<sup>409</sup>.

La terza variante virale identificata nello *Studio 3* in un individuo sieroprotetto era T126A. Alcuni autori hanno considerato le mutazioni a carico dell'amminoacido 126 di HBsAg come causa di variazioni significative della struttura proteica dell'antigene di superficie virale associate all'insorgenza di ceppi di HBV mutato in grado di eludere la risposta degli anticorpi neutralizzanti anti-HBs indotti da vaccino<sup>410,411</sup>. Inoltre, in uno studio precedentemente condotto da *Hsu et al.*, il mutante T126A era risultato più patogeno del wild type poiché riscontrato in tre bambini nati da madre HBsAg positiva, che avevano ricevuto vaccino e immunoglobuline alla nascita, che avevano però sviluppato rispettivamente sierconversione precoce per HBeAg, epatite fulminante ed epatite cronica. Quest'ultimo individuo inoltre risultava sieroprotetto ed il DNA materno era privo di mutazioni, inducendo a pensare che la mutazione T126A sia stata indotta da pressione selettiva esercitata da immunoprofilassi attiva e/o passiva<sup>412</sup>.

Le altre mutazioni a carico del gene S identificate nello *Studio 3* in soggetti opportunamente vaccinati ma privi di titolo anticorpale protettivo erano: Q129H, D144E e T143M.

La mutazione Q129H era stata individuata e studiata già negli anni '90. *Oon et al.* avevano rilevato la mutazione in un bambino nato da madre HBsAg positiva che aveva acquisito l'infezione da HBV a seguito di ciclo vaccinale primario completo e profilassi con immunoglobuline specifiche; tuttavia al momento dell'identificazione del ceppo mutato il soggetto non presentava titolo anticorpale protettivo<sup>130</sup>. *Chiou et al.* e *Coleman et al.*, in due differenti lavori, avevano osservato una ridotta reattività di HBsAg mutato rispetto al wild type nei confronti di anticorpi monoclonali e policlonali<sup>413,414</sup>. Successivamente *Mendy et al.* hanno rilevato la mutazione in un individuo vaccinato, mentre non è stata riscontrata in nessun portatore di HBsAg non vaccinato appartenente al gruppo di controllo; tuttavia per il soggetto vaccinato non era noto il titolo anticorpale anti-HBs al rilevamento del ceppo di HBV mutato<sup>415</sup>. *Ma Q. e Wang Y.*, analizzando 11,221 sequenze di HBV appartenenti agli 8 maggiori genotipi virali (A-H) presenti in banca dati NCBI, avevano osservato una frequenza di mutazioni a livello dell'amminoacido 129 superiore all'1% e con differenza statisticamente significativa tra i diversi genotipi virali: in particolare gli autori avevano riscontrato che la mutazione Q129H, coinvolta sia nella mancata rilevazione di HBsAg con test diagnostici, sia nell'evasione della risposta immunitaria indotta da vaccino o a seguito di terapia con immunoglobuline HBV-specifiche, aveva una frequenza superiore in ceppi virali di genotipo B (1.9%) e D (0.8%) rispetto ad E (0.6%) e C (0.1%) o addirittura A, F, G e H dove invece non era mai stata individuata<sup>404</sup>. Più recentemente, la mutazione Q129H è stata isolata da *Luongo et al.* in un ceppo virale D causa di infezione in un donatore di sangue caucasico di 55 anni vaccinato contro HBV 10 anni prima la diagnosi di epatite B e sieroprotetto nei confronti dell'agente patogeno<sup>416</sup>. Anche nello *Studio 3* la mutazione Q129H è stata isolata in un ceppo virale di genotipo D, ma il soggetto non risultava sieroprotetto nonostante la vaccinazione. Infine, *Golsaz-Shirazi et al.* sottolineano nuovamente che le mutazioni a carico dell'amminoacido 129 (in particolare Q129H) riducono drasticamente la reattività degli anticorpi nei confronti della proteina virale HBsAg<sup>417</sup>.

La mutazione D144E, più che correlata al vaccino anti-epatite B, è stata associata alla somministrazione di immunoglobuline e lamivudina; inoltre è stato osservato che tale mutazione sembra ridurre l'affinità di HBsAg agli anticorpi anti-HBs in grado di riconoscere l'antigene wild type. *Ghany et al.*, studiando l'impatto dei mutanti del gene S di HBV nei casi di reinfezione a seguito di

trapianto di fegato nonostante profilassi con immunoglobuline, avevano identificato la mutazione D144E in un trapiantato in studio; in particolare la mutazione veniva identificata nei ceppi virali post-trapianto ed al termine della terapia con HIG, mentre non veniva rilevata negli isolati di HBV pre-trapianto. In generale, in questo studio è stata osservata una correlazione significativa tra lo sviluppo di mutazioni a carico del determinante  $\alpha$  di HBsAg e la durata della terapia con immunoglobuline, tanto che la maggior parte delle mutazioni, tra cui D144E, revertavano al wild type durante il follow up post-terapia<sup>418</sup>. *Torresi et al.* hanno verificato in vitro la capacità di HBsAg mutato D144E/G145R, selezionato da terapia con lamivudina, di legare anticorpi anti-HBs prodotti in seguito a vaccinazione anti-epatite B ed hanno osservato che la presenza delle due mutazioni diminuisce l'antigenicità della proteina HBsAg e quindi una ridotta capacità di anti-HBs di legare l'antigene mutato<sup>151</sup>. Successivamente *Kim et al.* hanno rilevato la mutazione D144E in un trapiantato di fegato con infezione ricorrente da HBV post-trapianto nonostante somministrazione di immunoglobuline ad alte dosi e terapia con lamivudina. In particolare, a seguito del trapianto e della terapia, diverse mutazioni puntiformi sono emerse e sono diventate dominanti nel genoma di HBV sia a carico del gene Pol sia del gene S. Tra le mutazioni del determinante  $\alpha$  di HBsAg è stata identificata la variazione amminoacidica D144E, che a seguito di esperimenti di trasfezione ed impiego di test immunoenzimatici si è rivelata essere un'alterazione amminoacidica in grado di ridurre l'affinità della proteina HBsAg nei confronti degli anticorpi anti-HBs diretti contro l'antigene wild type, confermando il ruolo di D144E come immune escape mutant<sup>419</sup>. Più recentemente, gli stessi autori, a seguito della rilevazione della mutazione D144E in soggetti con epatite B occulta, hanno dimostrato nuovamente come tale mutazione possa alterare la capacità di legame dell'antigene mutato agli anticorpi anti-HBs<sup>420</sup>.

Infine, la mutazione T143M, isolata in donatori di sangue con infezione occulta da HBV, alcuni dei quali anti-HBs positivi, è stata recentemente studiata da *Theджа et al.* ed *Je et al.* che, in due differenti studi, attraverso l'impiego di specifici algoritmi, hanno previsto cambiamenti nella struttura terziaria di HBsAg mutato con significativa diminuzione dell'antigenicità della proteina di superficie virale nei confronti degli anticorpi anti-HBs<sup>421,422</sup>. Gli autori sottolineano che gli amminoacidi hanno proprietà differenti attribuibili alla rispettiva catena laterale e la struttura terziaria di ogni proteina dipende dalla composizione dei suoi amminoacidi: in particolare la diversa polarità determina l'idrofobicità del residuo amminoacidico, mentre le differenze di lunghezza della catena laterale possono influenzare l'ingombro sterico tra residui adiacenti. Per quanto riguarda la treonina e la metionina, il primo amminoacido ha una catena laterale polare e priva di cariche, mentre il secondo ha una catena laterale alifatica, non polare e più lunga in quanto contiene un gruppo metil-etil-solfurato. Sulla base delle differenze nelle proprietà delle catene laterali dei due amminoacidi si ipotizza che la presenza di una metionina al posto di una treonina in posizione 143 renda il secondo loop del determinante  $\alpha$  di HBsAg più idrofobico e meno capace di interagire con le molecole circostanti, tra cui, ad esempio, gli anticorpi anti-HBs specifici contro l'antigene di superficie in conformazione wild type.

Poiché nello *Studio 3* non sono stati fatti test specifici per valutare l'immunogenicità di HBsAg mutato, per tutte le mutazioni a carico della regione MHR di HBsAg rilevate nei soggetti opportunamente vaccinati di questo studio non è possibile stabilire con certezza se si tratti di sostituzioni amminoacidiche in grado di alterare la conformazione dell'antigene di superficie virale tanto da eludere la risposta immunitaria indotta da vaccino. Inoltre non può essere determinato il

processo selettivo che ha favorito l'insorgenza delle mutazioni. Studi futuri saranno necessari per far luce su queste questioni.

In conclusione, i risultati dello *Studio 3* hanno evidenziato che il programma di vaccinazione anti-epatite B italiano è efficiente nel prevenire e mantenere sotto controllo l'infezione da HBV. Infatti, i casi di epatite B acuta in soggetti opportunamente vaccinati non sono risultati frequenti, poiché nei 22 anni di periodo in studio sono stati stimati solo 5 potenziali fallimenti vaccinali l'anno su una popolazione totale di soggetti immunizzati pari a circa 20 milioni di individui. Anche le infezioni sostenute da mutanti virali sono rare e al momento non costituiscono una minaccia per l'attuale strategia vaccinale anti-epatite B italiana. Sforzi futuri per raggiungere un più elevato livello di fiducia pubblica in merito alla sicurezza ed all'efficacia della vaccinazione anti-epatite B sono però essenziali per mantenere elevati tassi di copertura vaccinale, soprattutto tra i soggetti a più elevato rischio di esposizione al virus. Un limite di questo studio è che il SEIEVA non colleziona dati sul follow up dei soggetti con infezione acuta da HBV, dunque si perde l'opportunità di poter determinare se la vaccinazione anti-epatite B, qualora non sia in grado di prevenire l'infezione acuta, sia però in grado di limitare le infezioni ad un periodo transitorio ed evitare la progressione verso la cronicizzazione. Tuttavia, dato che il maggior rischio di diventare portatore cronico di HBsAg è ampiamente dipendente dall'età di acquisizione dell'infezione<sup>423</sup>, il fatto che l'età media dei casi di questo studio sia significativamente aumentata con il passare degli anni è un dato rassicurante. Infatti, lo spostamento vaccino-indotto delle infezioni tra soggetti più anziani riduce il rischio di cronicizzazione, in quanto è stato dimostrato che l'acquisizione dell'infezione da adulto si traduce più frequentemente in un'infezione sintomatica ma transitoria. Studi futuri sono però necessari per monitorare questo aspetto ad oggi non valutabile.

Complessivamente il presente lavoro di tesi di dottorato vuole sottolineare come l'impatto della vaccinazione anti-epatite B sul territorio italiano sia stato uno dei più grandi successi raggiunti in termini di sanità pubblica e di quanto sia necessario un controllo continuo ed accurato delle strategie vaccinali adottate nel nostro Paese per non retrocedere e sperare in una futura eliminazione della trasmissione dell'agente patogeno.

# *BIBLIOGRAFIA*

# BIBLIOGRAFIA

1. Decreto Ministeriale 15 dicembre 1990. Sistema informativo delle malattie infettive e diffusive (1) Pubblicato nella Gazz. Uff. 8 gennaio 1991, n. 6.  
[http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_normativa\\_1357\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_normativa_1357_allegato.pdf).
2. World Health Organization.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> - aggiornato luglio 2016 - ultimo accesso dicembre 2016.
3. Lurman A. *Eine icterus epidemic*. Berl Klin Wochenschr 1885; 22: 20-23.
4. McDonald S. *Acute yellow atrophy*. Edinb Med J 1908; 15: 208.
5. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. *Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis*. Lancet 1970; 1: 695-98.
6. Hirschman SZ, Vernace SJ, Schaffner F. *D.N.A. polymerase in preparations containing Australia antigen*. Lancet 1971; 1: 1099-103.
7. Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, et al. *DNA Polymerase Associated with Human Hepatitis B Antigen*. J Virol 1973; 12: 995-1005.
8. Thomas E, Yoneda M, Schiff ER. *Viral hepatitis: past and future of HBV and HDV*. Cold Spring Harb Perspect Med 2015; 5: a021345.
9. Suh A, Brosius J, Schmitz J, et al. *The genome of a Mesozoic paleovirus reveals the evolution of hepatitis B viruses*. Nat commun 2013; 4: 1791.
10. Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, et al. *Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates*. Hepatology 2013; 57: 908-16.
11. Kahila Bar-Gal G, Kim MJ, Klein A, et al. *Tracing hepatitis B virus to the 16th century in a Korean mummy*. Hepatology 2012; 56: 1671-80.
12. Schaefer S. *Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes*. World J Gastroenterol 2007; 13: 14-21.
13. Seeger C, Mason WS. *Molecular biology of hepatitis B virus infection*. Virology 2015; 479-480: 672-86.
14. Barker LF, Almeida JD, Hoofnagle JH, et al. *Hepatitis B core antigen: immunology and electron microscopy*. J Virol 1974; 14: 1552-58.
15. Onodera S, Ohori H, Yamaki M, et al. *Electron microscopy of human hepatitis B virus cores by negative staining-carbon film technique*. J Med Virol 1982; 10: 147-55.
16. Ganem D. *Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles*. Curr Top Microbiol Immunol 1991; 168: 61-83.
17. Bruss V. *Hepatitis B virus morphogenesis*. World J Gastroenterol 2007; 13: 65-73.

18. Ganem D, Schneider RJ. *Hepadnaviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe DM, et al., eds. *Fields Virology*, 4th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 2923-69.
19. Patient R, Hourieux C, Roingeard P. *Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles*. *Cell Microbiol*. 2009; 11: 1561-70.
20. Will H, Cattaneo R, Koch HG, et al. *Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees*. *Nature* 1982; 299: 740-42.
21. Summers J, O'Connell A, Millman I. *Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 4597-601.
22. Gerlich WH, Robinson WS. *Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand*. *Cell* 1980; 21: 801-09.
23. Seeger C, Ganem D, Varmus HE. *Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy*. *Science* 1986; 232: 477-84.
24. Will H, Reiser W, Weimer T, et al. *Replication strategy of human hepatitis B virus*. *J Virol* 1987; 61: 904-11.
25. Kann M. *Structural and molecular virology*. In: Lai CL, Locarnini S. eds. London: International Medical Press, 2002: 9-22.
26. Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. *The hepatitis B virus and common mutants*. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 5-20.
27. Dejean A, Sonigo P, Wain-Hobson S, et al. *Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 5350-54.
28. Haines KM, Loeb DD. *The sequence of the RNA primer and the DNA template influence the initiation of plus-strand DNA synthesis in hepatitis B virus*. *J Mol Biol* 2007; 370: 471-80.
29. Shaul Y, Ben-Levy R, De-Medina T. *High affinity binding site for nuclear factor I next to the hepatitis B virus S gene promoter*. *EMBO J* 1986; 5: 1967-71.
30. Masuda M, Lee G, Yuasa T, et al. *Upstream region of hepatitis B virus S gene responsible for transcriptional stimulation by dexamethasone*. *Microbiol Immunol* 1988; 32: 741-47.
31. Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. *Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 566-70.
32. Kramvis A, Kew MC. *The core promoter of hepatitis B virus*. *J Viral Hepat* 1999; 6: 415-27.
33. Treinin M, Laub O. *Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene*. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 545-48.
34. Antonucci TK, Rutter WJ. *Hepatitis B virus (HBV) promoters are regulated by the HBV enhancer in a tissue-specific manner*. *J Virol* 1989; 63: 579-83.
35. Elfassi E. *Broad specificity of the hepatitis B enhancer function*. *Virology* 1987; 160: 259-62.
36. Wang Y, Chen P, Wu X, et al. *A new enhancer element, ENII, identified in the X gene of hepatitis B virus*. *J Virol* 1990; 64: 3977-81.

37. Tur-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y, et al. *Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element*. Proc Natl Acad Sci U S A 1986; 83: 1627-31.
38. Bock CT, Kubicka S, Manns MP, et al. *Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor*. Hepatology 1999; 29: 1236-47.
39. Lo WY, Ting LP. *Repression of enhancer II activity by a negative regulatory element in the hepatitis B virus genome*. J Virol 1994; 68: 1758-64.
40. Simonsen CC, Levinson AD. *Analysis of processing and polyadenylation signals of the hepatitis B virus surface antigen gene by using simian virus 40-hepatitis B virus chimeric plasmids*. Mol Cell Biol 1983; 3: 2250-58.
41. Kramvis A, Kew MC. *Structure and function of the encapsidation signal of hepadnaviridae*. J Viral Hepat 1998; 5: 357-67.
42. Donello JE, Beeche AA, Smith GJ, et al. *The hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element is composed of two subelements*. J Virol 1996; 70: 4345-51.
43. Price PM, Mohamad A, Zelent A, et al. *Translational selection in the expression of the hepatitis B virus envelope proteins*. DNA 1988; 7: 417-22.
44. Peterson DL. *Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen*. J Biol Chem 1981; 256: 6975-83.
45. Howard CR, Allison LM. *Hepatitis B surface antigen variation and protective immunity*. Intervirology 1995; 38: 35-40.
46. Stibbe W, Gerlich WH. *Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen*. J Virol 1983; 46: 626-28.
47. Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, et al. *Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence*. J Virol 1984; 52: 396-402.
48. Milich DR, Thornton GB, Neurath AR, et al. *Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B surface antigen*. Science 1985; 228: 1195-99.
49. Milich DR, McLachlan A, Chisari FV, et al. *Immune response to the pre-S(1) region of the hepatitis B surface antigen (HBsAg): a pre-S(1)-specific T cell response can bypass nonresponsiveness to the pre-S(2) and S regions of HBsAg*. J Immunol 1986; 137: 315-22.
50. Heermann KH, Kruse F, Seifer M, et al. *Immunogenicity of the gene S and Pre-S domains in hepatitis B virions and HBsAg filaments*. Intervirology 1987; 28: 14-25.
51. Poisson F, Severac A, Hourieux C, et al. *Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle*. Virology 1997; 228: 115-20.
52. Nassal M. *The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly*. J Virol 1992; 66: 4107-16.
53. Zlotnick A, Venkatakrishnan B, Tan Z, et al. *Core protein: A pleiotropic keystone in the HBV lifecycle*. Antiviral Res 2015; 121: 82-93.



54. Bruss V, Gerlich WH. *Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein.* Virology 1988; 163: 268-75.
55. Schlicht HJ, Schaller H. *The secretory core protein of human hepatitis B virus is expressed on the cell surface.* J Virol 1989; 63: 5399-404.
56. Standring DN, Ou JH, Masiarz FR, et al. *A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in Xenopus oocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85: 8405-09.
57. McGlynn E, Reutener S, Matter A, et al. *Hepatitis B virus polymerase gene: expression of the long open reading frame using the baculovirus expression system.* J Gen Virol 1992; 73: 1515-19.
58. Radziwill G, Tucker W, Schaller H. *Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity.* J Virol 1990; 64: 613-20.
59. Clark DN, Flanagan JM, Hu J. *Mapping of Functional Subdomains in Terminal Protein Domain of Hepatitis B Virus Polymerase.* J Virol. 2016. Doi: 10.1128/JVI.01785-16.
60. Wei X, Peterson DL. *Expression, purification and characterization of an active RNase H domain of the hepatitis B viral polymerase.* J Biol Chem 1996; 271: 32617-22.
61. Zahm P, Hofschneider PH, Koshy R. *The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepatocarcinogenesis.* Oncogene 1988; 3: 169-77.
62. Tang H, Oishi N, Kaneko S, et al. *Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein.* Cancer Sci 2006; 97: 977-83.
63. Gong DY, Chen EQ, Huang FJ, et al. *Role and functional domain of hepatitis B virus X protein in regulating HBV transcription and replication in vitro and in vivo.* Viruses 2013; 5: 1261-71.
64. Liu S, Koh SS, Lee CG. *Hepatitis B Virus X Protein and Hepatocarcinogenesis.* Int J Mol Sci 2016; 17: E940.
65. Slagle BL, Bouchard MJ. *Hepatitis B Virus X and Regulation of Viral Gene Expression.* Cold Spring Harb Perspect Med 2016; 6: a021402.
66. Summers J, Mason WS. *Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate.* Cell 1982; 29: 403-15.
67. Gish RG, Given BD, Lai CL, et al. *Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities.* Antiviral Res 2015; 121: 47-58.
68. Blondot ML, Bruss V, Kann M. *Intracellular transport and egress of hepatitis B virus.* J Hepatol 2016; 64: S49-59.
69. Tong S, Revill P. *Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability.* J Hepatol 2016; 64: S4-16.
70. Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, et al. *Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes.* Gastroenterology 2014; 146: 1070-83.
71. Yan H, Peng B, Liu Y, et al. *Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide.* J Virol 2014; 88: 3273-84.
72. Yan H, Liu Y, Sui J, et al. *NTCP opens the door for hepatitis B virus infection.* Antiviral Res 2015; 121: 24-30.

73. Kann M, Schmitz A, Rabe B. *Intracellular transport of hepatitis B virus*. World J Gastroenterol 2007; 13: 39-47.
74. Cattaneo R, Will H, Schaller H. *Hepatitis B virus transcription in the infected liver*. EMBO J 1984; 3: 2191-96.
75. Enders GH, Ganem D, Varmus H. *Mapping the major transcripts of ground squirrel hepatitis virus: the presumptive template for reverse transcriptase is terminally redundant*. Cell 1985; 42: 297-308.
76. Warner N, Locarnini S. *Replication of hepatitis B virus*. In: Boyer TD, Manns MP, Sanyal AJ. eds. Zakim and Boyer's Hepatology: A textbook of Liver Disease, 6th ed. Elsevier Philadelphia, 2012.
77. Knaus T, Nassal M. *The encapsidation signal on the hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem-loop structure that is critical for its function*. Nucleic Acids Res 1993; 21: 3967-75.
78. Brahmania M, Feld J, Arif A, et al. *New therapeutic agents for chronic hepatitis B*. Lancet Infect Dis 2016; 16: e10-21.
79. Diminsky D, Moav N, Gorecki M, et al. *Physical, chemical and immunological stability of CHO-derived hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles*. Vaccine 1999; 18: 3-17.
80. Bond WW, Favero MS, Petersen NJ, et al. *Inactivation of hepatitis B virus by intermediate-to-high-level disinfectant chemicals*. J Clin Microbiol 1983; 18: 535-38.
81. Kobayashi H, Tsuzuki M, Koshimizu K, et al. *Susceptibility of hepatitis B virus to disinfectants or heat*. J Clin Microbiol 1984; 20: 214-16.
82. Hollinger FB, Liang TJ. *Hepatitis B Virus*. In: Knipe DM et al., eds. Fields Virology, 4th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 2971-3036.
83. Allweiss L, Dandri M. *Experimental in vitro and in vivo models for the study of human hepatitis B virus infection*. J Hepatol 2016; 64: S17-31.
84. Koff RS. *Problem hepatitis viruses: the mutants*. Am J Med 1994; 96: 52S-56S.
85. Bonhoeffer S, Sniegowski P. *Virus evolution: the importance of being erroneous*. Nature 2002; 420: 367-69.
86. Hollinger FB. *Hepatitis B virus genetic diversity and its impact on diagnostic assays*. J Viral Hepat 2007; 14: 11-15.
87. Caligiuri P, Cerruti R, Icardi G, et al. *Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection*. World J Gastroenterol 2016; 22: 145-54.
88. Fares MA, Holmes EC. *A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV)*. J Mol Evol 2002; 54: 807-14.
89. Zhou Y, Holmes EC. *Bayesian estimates of the evolutionary rate and age of hepatitis B virus*. J Mol Evol 2007; 65: 197-205.
90. Zaaijer HL, Bouter S, Boot HJ. *Substitution rate of the hepatitis B virus surface gene*. J Viral Hepat 2008; 15: 239-45.
91. Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E, et al. *Spatial and temporal dynamics of hepatitis B virus D genotype in Europe and the Mediterranean Basin*. PLoS One 2012; 7: e37198.

92. Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, et al. *Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates*. Hepatology 2013; 57: 908-16.
93. Tedder RS, Bissett SL, Myers R, et al. *The 'Red Queen' dilemma--running to stay in the same place: reflections on the evolutionary vector of HBV in humans*. Antivir Ther 2013; 18: 489-96.
94. Gojobori T, Yamaguchi Y, Ikeo K, et al. *Evolution of pathogenic viruses with special reference to the rates of synonymous and nonsynonymous substitutions*. Jpn J Genet 1994; 69: 481-88.
95. Mizokami M, Orito E, Ohba K, et al. *Constrained evolution with respect to gene overlap of hepatitis B virus*. J Mol Evol 1997; 44: S83-90.
96. Maman Y, Blancher A, Benichou J, et al. *Immune-induced evolutionary selection focused on a single reading frame in overlapping hepatitis B virus proteins*. J Virol 2011; 85: 4558-66.
97. Torres C, Fernández MD, Flichman DM, et al. *Influence of overlapping genes on the evolution of human hepatitis B virus*. Virology 2013; 441: 40-48.
98. Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK. *Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen*. J Immunol 1972; 109: 8424-28.
99. Le Bouvier GL, McCollum RW, Hierholzer WJ, et al. *Subtypes of Australia antigen and hepatitis-B virus*. JAMA 1972; 222: 928-30.
100. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. *Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes*. J Gen Virol 1988; 69: 2575-83.
101. Norder H, Couroucé AM, Magnius LO. *Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes*. J Gen Virol 1992; 73: 3141-45.
102. Kay A, Zoulim F. *Hepatitis B virus genetic variability and evolution*. Virus Res 2007; 127: 164-76.
103. Kramvis A. *Genotypes and Genetic Variability of Hepatitis B Virus*. Intervirology 2014; 57: 141-50.
104. Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, et al. *Genetic diversity of Hepatitis B Virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes*. Intervirology 2004; 47: 289-309.
105. Sunbul M. *Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical Importance*. World J Gastroenterol 2014; 20: 5427-34.
106. Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E, et al. *Enigmatic origin of hepatitis B virus: an ancient travelling companion or a recent encounter?* World J Gastroenterol 2014; 20: 7622-34.
107. Olinger CM, Jutavijittum P, Hübschen JM, et al. *Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia*. Emerg Infect Dis 2008; 14: 1777-80.
108. Tran TT, Trinh TN, Abe K. *New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam*. J Virol 2008; 82: 5657-63.
109. Arankalle VA, Gandhe SS, Borkakoty BJ, et al. *A novel HBV recombinant (genotype I) similar to Vietnam/Laos in a primitive tribe in eastern India*. J Viral Hepat 2010; 17: 501-10.

110. Yu H, Yuan Q, Ge SX, et al. *Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I"*. PLoS One 2010; 5: e9297.
111. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. *A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J*. J Virol 2009; 83: 10538-47.
112. Locarnini S, Littlejohn M, Aziz MN, et al. *Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV)*. Semin Cancer Biol 2013; 23: 561-75.
113. Locarnini S. *Molecular virology of hepatitis B virus*. Semin Liver Dis 2004; 24: 3-10.
114. Buckwold VE, Xu Z, Chen M, et al. *Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication*. J Virol 1996; 70: 5845-51.
115. Li JS, Tong SP, Wen YM, et al. *Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region*. J Virol 1993; 67: 5402-10.
116. Lok AS, Akarca U, Greene S. *Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal*. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 4077-81.
117. Lapalus M, Laouenan C, Cardoso AC, et al. *Precore/Core promoter variants to predict significant fibrosis in both HBeAg positive and negative chronic hepatitis B*. Liver Int 2015; 35: 2082-89.
118. Ducancelle A, Pivert A, Bertrais S, et al. *Different precore/core mutations of hepatitis B interact with, limit, or favor liver fibrosis severity*. J Gastroenterol Hepatol 2016; 31: 1750-56.
119. Zhong YW, Di FL, Liu C, et al. *Hepatitis B virus basal core promoter/precore mutants and association with liver cirrhosis in children with chronic hepatitis B virus infection*. Clin Microbiol Infect 2016; 22: 379.
120. Sonneveld MJ, Rijckborst V, Zeuzem S, et al. *Presence of precore and core promoter mutants limits the probability of response to peginterferon in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B*. Hepatology 2012; 56: 67-75.
121. Chen Z, Tang J, Cai X, et al. *HBx mutations promote hepatoma cell migration through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway*. Cancer Sci 2016; 107: 1380-89.
122. Kim H, Lee SA, Kim BJ. *X region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity*. World J Gastroenterol 2016; 22: 5467-78.
123. Ng KY, Chai S, Tong M, et al. *C-terminal truncated hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinogenesis through induction of cancer and stem cell-like properties*. Oncotarget 2016; 7: 24005-17.
124. Cooreman MP, Leroux-Roels G, Paulij WP. *Vaccine- and Hepatitis B Immune Globulin-Induced Escape Mutations of Hepatitis B Virus Surface Antigen*. J Biomed Sci 2001; 8: 237-47.
125. Coppola N, Onorato L, Minichini C, et al. *Clinical significance of hepatitis B surface antigen mutants*. World J Hepatol 2015; 7: 2729-39.
126. Romanò L, Paladini S, Galli C, et al. *Hepatitis B vaccination*. Hum Vaccin Immunother 2015; 11: 53-57.
127. Zhu HL, Li X, Li J, et al. *Genetic variation of occult hepatitis B virus infection*. World J Gastroenterol 2016; 22: 3531-46.

128. Zanetti AR, Tanzi E, Manzillo G, et al. *Hepatitis B variant in Europe*. Lancet 1988; 2: 1132-33.
129. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, et al. *Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus*. Lancet 1990; 336: 325-29.
130. Oon CJ, Lim GK, Ye Z, et al. *Molecular epidemiology of hepatitis B virus vaccine variants in Singapore*. Vaccine 1995; 13: 699-702.
131. Seddigh-Tonekaboni S, Lim WL, Young B, et al. *Hepatitis B surface antigen variants in vaccinees, blood donors and an interferon-treated patient*. J Viral Hepat 2001; 8: 154-58.
132. Tabor E. *Infections by hepatitis B surface antigen gene mutants in Europe and North America*. J Med Virol 2006; 78: S43-47.
133. Shahmoradi S, Yahyapour Y, Mahmoodi M, et al. *High prevalence of occult hepatitis B virus infection in children born to HBsAg-positive mothers despite prophylaxis with hepatitis B vaccination and HBIG*. J Hepatol 2012; 57: 515-21.
134. Waters JA, Kennedy M, Voet P, et al. *Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant*. J Clin Invest 1992; 90: 2543-47.
135. Zuckerman JN, Zuckerman AJ. *Mutations of the surface protein of hepatitis B virus*. Antiviral Res 2003; 60: 75-78.
136. Jammeh S, Thomas HC, Karayiannis P. *Replicative competence of the T131I, K141E, and G145R surface variants of hepatitis B Virus*. J Infect Dis 2007; 196: 1010-13.
137. Ogata N, Zanetti AR, Yu M, et al. *Infectivity and pathogenicity in chimpanzees of a surface gene mutant of hepatitis B virus that emerged in a vaccinated infant*. J Infect Dis 1997; 175: 511-23.
138. Chen BF, Liu CJ, Jow GM, et al. *High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases*. Gastroenterology 2006; 130: 1153-68.
139. Li X, Qin Y, Liu Y, et al. *PreS deletion profiles of hepatitis B virus (HBV) are associated with clinical presentations of chronic HBV infection*. J Clin Virol 2016; 82: 27-32.
140. Coppola N, Tonziello G, Colombatto P, et al. *Lamivudine-resistant HBV strain rtM204V/I in acute hepatitis B*. J Infect 2013; 67: 322-28.
141. Delaney WE, Yang H, Westland CE, et al. *The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro*. J Virol 2003; 77: 11833-41.
142. Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N, et al. *Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 3867-74.
143. Liu Y, Xu Z, Wang Y, et al. *rtM204Q may serve as a novel lamivudine-resistance-associated mutation of hepatitis B virus*. PLoS One 2014; 9: e89015.
144. Lai CL, Dienstag J, Schiff E, et al. *Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B*. Clin Infect Dis 2003; 36: 687-96.
145. Angus P, Vaughan R, Xiong S, et al. *Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase*. Gastroenterology 2003; 125: 292-97.

146. Jiang SW, Yao LP, Hu AR, et al. *Resistant mutants induced by adefovir dipivoxil in hepatitis B virus isolates*. World J Gastroenterol 2014; 20: 17100-06.
147. Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, et al. *Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 902-11.
148. Villet S, Ollivet A, Pichoud C, et al. *Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient*. J Hepatol 2007; 46: 531-38.
149. Sheldon J, Camino N, Rodés B, et al. *Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir*. Antivir Ther 2005; 10: 727-34.
150. Buti M, Tsai N, Petersen J, et al. *Seven-year efficacy and safety of treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B virus infection*. Dig Dis Sci 2015; 60: 1457-64.
151. Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, et al. *Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy*. Virology 2002; 293: 305-13.
152. Sloan RD, Ijaz S, Moore PL, et al. *Antiviral resistance mutations potentiate hepatitis B virus immune evasion through disruption of its surface antigen a determinant*. Antivir Ther 2008; 13: 439-47.
153. Centers for Disease Control and Prevention.  
<http://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/> - ultimo accesso dicembre 2016.
154. European Centre for Disease Prevention and Control.  
[http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/hepatitis\\_B/Pages/index.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/hepatitis_B/Pages/index.aspx) - ultimo accesso dicembre 2016.
155. Franco E, Bagnato B, Marino MG, et al. *Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries*. World J Hepatol 2012; 4: 74-80.
156. Dwyre DM, Fernando LP, Holland PV. *Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century*. Vox Sanguinis 2011; 100: 92-98.
157. Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. *Pathogenesis of hepatitis B virus infection*. Pathol Biol (Paris) 2010; 58: 258-66.
158. Busch k, Thimme R. *Natural history of chronic hepatitis B virus infection*. Med Microbiol Immunol 2015; 204: 5-10.
159. Bertoletti A, Ferrari C. *Adaptive immunity in HBV infection*. J Hepatol 2016; 64: S71-83.
160. Wieland SF, Chisari FV. *Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses*. J Virol 2005; 79: 9369-80.
161. Luangsay S, Gruffaz M, Isorce N, et al. *Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus*. J Hepatol 2015; 63: 1314-22.
162. Thimme R, Wieland S, Steiger C, et al. *CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection*. J Virol 2003; 77: 68-76.

163. Guidotti LG, Inverso D, Sironi L, et al. *Immunosurveillance of the liver by intravascular effector CD8(+) T cells.* Cell 2015; 161: 486-500.
164. Benechet AP, Iannacone M. *Determinants of hepatic effector CD8+ T cell dynamics.* J Hepatol 2016. Doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.011.
165. Zheng M, Sun R, Wei H, et al. *NK Cells Help Induce Anti-Hepatitis B Virus CD8+ T Cell Immunity in Mice.* J Immunol 2016; 196: 4122-31.
166. Trautmann T, Kozik JH, Carambia A, et al. *CD4+ T-cell help is required for effective CD8+ T cell-mediated resolution of acute viral hepatitis in mice.* PLoS One 2014; 9: e86348.
167. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, et al. *Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection.* J Immunol 1990; 145: 3442-49.
168. Urbani S, Boni C, Amadei B, et al. *Acute phase HBV-specific T cell responses associated with HBV persistence after HBV/HCV coinfection.* Hepatology 2005; 41: 826-31.
169. Asabe S, Wieland SF, Chattopadhyay PK, et al. *The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection.* J Virol 2009; 83: 9652-62.
170. Zgair AK, Ghafil JA, Al-Sayidi RH. *Direct role of antibody-secreting B cells in the severity of chronic hepatitis B.* J Med Virol 2015; 87: 407-16.
171. Kao JH. *Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers.* Expert Rev Gastroenterol Hepatol 2008; 2: 553-62.
172. Song JE, Kim DY. *Diagnosis of hepatitis B.* Ann Transl Med 2016; 4: 338.
173. Veropalumbo E, Marrone A, Vallefuoco L, et al. *Immunocompromised patients with HBsAg a determinant mutants: comparison of HBsAg diagnostic assays.* Intervirology 2010; 53: 183-87.
174. Cui Y, Zhang T, Yan Y, et al. *Identification of a mutation in Hepatitis B virus surface antigen capable of evading ELISA screening.* Genet Mol Res 2016; 15.
175. Osiowy C, Kowalec K, Giles E. *Discordant diagnostic results due to a hepatitis B virus T123A HBsAg mutant.* Diagn Microbiol Infect Dis 2016; 85: 328-33.
176. Mühlbacher A, Weber B, Bürgisser P, et al. *Multicenter study of a new fully automated HBsAg assay with enhanced sensitivity for the detection of HBV mutants.* Med Microbiol Immunol 2008; 197: 55-64.
177. Lou SC, Pearce SK, Lukaszewska TX, et al. *An improved Abbott ARCHITECT assay for the detection of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg).* J Clin Virol 2011; 51: 59-63.
178. Yang L, Song LW, Fang LL, et al. *Evaluation of a novel chemiluminescent microplate enzyme immunoassay for hepatitis B surface antigen detection.* J Virol Methods 2016; 228: 55-59.
179. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, et al. *Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection.* J Hepatol 2008; 49: 652-57.
180. Makavandi M. *Update on occult hepatitis B virus infection.* World J Gastroenterol 2016; 22: 8720-34.

181. Chan HL, Thompson A, Martinot-Peignoux M, et al. *Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 - a core group report*. J Hepatol 2011; 55: 1121-31.
182. Martinot-Peignoux M, Asselah T, Marcellin P. *HBsAg quantification to optimize treatment monitoring in chronic hepatitis B patients*. Liver Int 2015; 35: 82-90.
183. Jack AD, Hall AJ, Maine N, et al. *What level of hepatitis B antibody is protective?* J Infect Dis 1999; 179: 489-92.
184. Chen CJ, Yang HI, Iloeje UH, et al. *Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B*. Hepatology 2009; 49: S72-84.
185. Osiowy C, Coffin C, Andonov A. *Review of Laboratory Tests used in Monitoring Hepatitis B Response to Pegylated Interferon and Nucleos(t)ide Analog Therapy*. Curr Treat Options Infect Dis 2016; 8: 177-93.
186. Krajden M, McNabb G, Petric M. *The laboratory diagnosis of hepatitis B virus*. Can J Infect Dis Med Microbiol 2005; 16: 65-72.
187. Mohamed S, Raimondo A, Pénaranda G, et al. *Dried blood spot sampling for hepatitis B virus serology and molecular testing*. PLoS One 2013; 8: e61077.
188. Cruz HM, Scalioni Lde P, de Paula VS, et al. *Evaluating HBsAg rapid test performance for different biological samples from low and high infection rate settings & populations*. BMC Infect Dis 2015; 15: 548.
189. Stene-Johansen K, Yaqoob N, Overbo J, et al. *Dry Blood Spots a Reliable Method for Measurement of Hepatitis B Viral Load in Resource-Limited Settings*. PLoS One 2016; 11: e0166201.
190. Ghosh M, Nandi S, Dutta S, et al. *Detection of hepatitis B virus infection: A systematic review*. World J Hepatol 2015; 7: 2482-91.
191. Villar LM, Cruz HM, Barbosa JR, et al. *Update on hepatitis B and C virus diagnosis*. World J Virol 2015; 4: 323-42.
192. Tanwar S, Dusheiko G. *Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis?* Curr Gastroenterol Rep 2012; 14: 37-46.
193. Bayliss J, Nguyen T, Lesmana CR, et al. *Advances in the molecular diagnosis of hepatitis B infection: providing insight into the next generation of disease*. Semin Liver Dis 2013; 33: 113-21.
194. Chu CM. *Natural history of chronic hepatitis B virus infection in adults with emphasis on the occurrence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol Hepatol 2000; 15: E25-30.
195. Croagh CM, Lubel JS. *Natural history of chronic hepatitis B: phases in a complex relationship*. World J Gastroenterol 2014; 20: 10395-404.
196. Trépo C, Chan HL, Lok A. *Hepatitis B virus infection*. Lancet 2014; 384: 2053-63.
197. McMahon BJ. *The natural history of chronic hepatitis B virus infection*. Hepatology 2009; 49: S45-55.
198. Pan CQ, Zhang JX. *Natural History and Clinical Consequences of Hepatitis B Virus Infection*. Int J Med Sci 2005; 2: 36-40.
199. Pollicino T, Saitta C. *Occult hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol 2014; 20: 5951-61.



200. Kao JH. *Role of viral factors in the natural course and therapy of chronic hepatitis B*. *Hepatology* 2007; 1: 415-30.
201. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, et al. *Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013*. *Lancet* 2015; 386: 1546-55. *Lancet* 2015; 386: 1546-55.
202. Hepatitis B in the WHO European Region.  
[http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0009/283356/fact-sheet-en-hep-b.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0009/283356/fact-sheet-en-hep-b.pdf)
203. European Centre for Disease Prevention and Control. *Annual Epidemiological Report 2016 – Hepatitis B*. Stockholm: ECDC; 2016.  
[http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/hepatitis\\_B/Pages/Annual-Epidemiological-Report-2016.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/hepatitis_B/Pages/Annual-Epidemiological-Report-2016.aspx)
204. Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA).  
<http://www.iss.it/seieva/> - aggiornato luglio 2016 - ultimo accesso dicembre 2016.
205. Lok AS, McMahon BJ. *Chronic hepatitis B: update 2009*. *Hepatology* 2009; 50: 661-62.
206. European Association For The Study Of The Liver. *EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection*. *J Hepatol* 2012; 57: 167-85.
207. Sarin SK, Kumar M, Lau GK, et al. *Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update*. *Hepatology* 2016; 10: 1-98.
208. Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al. *Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial*. *Lancet* 2005; 365: 123-9.
209. Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, et al. *Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B*. *N Engl J Med* 2005; 352: 2682-95.
210. Marcellin P, Bonino F, Lau GK, et al. *Sustained response of hepatitis B e antigen-negative patients 3 years after treatment with peginterferon alpha-2a*. *Gastroenterology* 2009; 136: 2169-79.
211. Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, et al. *Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovirdipivoxil for chronic hepatitis B*. *N Engl J Med* 2008; 359: 2442-55.
212. Chang TT, Lai CL, Kew Yoon S, et al. *Entecavir treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B*. *Hepatology* 2010; 51: 422-30.
213. Ono A, Suzuki F, Kawamura Y, et al. *Long-term continuous entecavir therapy in nucleos(t)ide-naïve chronic hepatitis B patients*. *J Hepatol* 2012; 57: 508-14.
214. Chang TT, Liaw YF, Wu SS, et al. *Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis/cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B*. *Hepatology* 2010; 52: 886-93.
215. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, et al. *Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection*. *Hepatology* 2013; 58: 98-107.
216. Marcellin P, Gane E, Buti M, et al. *Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study*. *Lancet* 2013; 381: 468-75.
217. Buti M, Fung S, Gane E, et al. *Long-term clinical outcomes in cirrhotic chronic hepatitis B patients treated with tenofovir disoproxil fumarate for up to 5 years*. *Hepatology* 2015; 9: 243-50.

218. Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, et al. *Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy.* Hepatology 2009; 49: 1503-14.
219. Pfaender S, von Hahn T, Steinmann J, et al. *Prevention strategies for blood-borne viruses-in the Era of vaccines, direct acting antivirals and antiretroviral therapy.* Rev Med Virol 2016; 26: 330-39.
220. Narin I, Gedik H, Voss A. *Blood and body fluid exposures in health-care settings: risk reduction practices and postexposure prophylaxis for health-care workers.* Curr Infect Dis Rep 2012; 14: 607-11.
221. Nelson NP, Jamieson DJ, Murphy TV. *Prevention of Perinatal Hepatitis B Virus Transmission.* J Pediatric Infect Dis Soc 2014; 3: S7-S12.
222. Zuckerman JN. *Review: hepatitis B immune globulin for prevention of hepatitis B infection.* J Med Virol 2007; 79: 919-21.
223. Edlich RF, Gubler K, Wallis AG, et al. *Postexposure prophylaxis for deadly bloodborne viral infections.* J Environ Pathol Toxicol Oncol 2010; 29: 293-315.
224. Krugman S, Giles JP, Hammond J. *Viral hepatitis, type B (MS-2 strain) prevention with specific hepatitis B immune serum globulin.* JAMA 1971; 218: 1665-70.
225. Maupas P, Goudeau A, Coursaget P, et al. *Immunisation against hepatitis B in man.* Lancet 1976; 1: 1367-70.
226. Szmunes W, Stevens CE, Zang EA, et al. *A controlled clinical trial of the efficacy of the hepatitis B vaccine (Heptavax B): a final report.* Hepatology 1981; 1: 377-85.
227. But DY, Lai CL, Lim WL, et al. *Twenty-two years follow-up of a prospective randomized trial of hepatitis B vaccines without booster dose in children: final report.* Vaccine 2008; 26: 6587-91.
228. McMahon BJ, Dentinger CM, Bruden D, et al. *Antibody levels and protection after hepatitis B vaccine: results of a 22-year follow-up study and response to a booster dose.* J Infect Dis 2009; 200: 1390-96.
229. Wu Q, Zhuang GH, Wang XL, et al. *Antibody levels and immune memory 23 years after primary plasma-derived hepatitis B vaccination: results of a randomized placebo-controlled trial cohort from China where endemicity is high.* Vaccine 2011; 29: 2302-07.
230. Simons BC, Spradling PR, Bruden DJ, et al. *Longitudinal Hepatitis B Vaccine Cohort Demonstrates Long-lasting Hepatitis B Virus (HBV) Cellular Immunity Despite Loss of Antibody Against HBV Surface Antigen.* J Infect Dis 2016; 214: 273-80.
231. Gerin JL, Purcell RH. *New approaches to hepatitis B vaccines.* Prog Clin Biol Res 1983; 143: 369-77.
232. McAleer WJ, Buynak EB, Margetter RZ, et al. *Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast.* Nature 1984; 307: 178-80.
233. Dandolos E, Roumeliotou-Karayannis A, Richardson SC, et al. *Safety and immunogenicity of a recombinant hepatitis B vaccine.* J Med Virol 1985; 17: 57-62.
234. Brown SE, Stanley C, Howard CR, et al. *Antibody responses to recombinant and plasma derived hepatitis B vaccines.* Br Med J (Clin Res Ed) 1986; 292: 159-61.
235. Goudeau A, Denis F, Mounier M, et al. *Comparative multicentre study of the immunogenicity of different hepatitis B vaccines in healthy volunteers.* Postgrad Med J 1987; 63: 125-28.

236. André FE. *Summary of safety and efficacy data on a yeast-derived hepatitis B vaccine*. Am J Med 1989; 87: 14S-20S.
237. Freed GL, Cowan AE, Clark SJ, et al. *Use of a new combined vaccine in pediatric practices*. Pediatrics 2006; 118: e251-57.
238. Kalies H, Grote V, Verstraeten T, et al. *The use of combination vaccines has improved timeliness of vaccination in children*. Pediatr Infect Dis J 2006; 25: 507-12.
239. Tsai IJ, Chang MH, Chen HL, et al. *Immunogenicity and reactogenicity of the combined hepatitis A and B vaccine in young adults*. Vaccine 2000; 19: 437-41.
240. Van Damme P, Van der Wielen M. *Combining hepatitis A and B vaccination in children and adolescents*. Vaccine 2001; 19: 2407-12.
241. Murdoch DL, Goa K, Figgitt DP. *Combined hepatitis A and B vaccines: a review of their immunogenicity and tolerability*. Drugs 2003; 63: 2625-49.
242. Avdicová M, Prikazský V, Hudecková H, et al. *Immunogenicity and reactogenicity of a novel hexavalent DTPa-HBV-IPV/Hib vaccine compared to separate concomitant injections of DTPa-IPV/Hib and HBV vaccines, when administered according to a 3, 5 and 11 month vaccination schedule*. Eur J Pediatr 2002; 161: 581-87.
243. Arístegui J, Dal-Ré R, Díez-Delgado J, et al. *Comparison of the reactogenicity and immunogenicity of a combined diphtheria, tetanus, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated polio (DTPa-HBV-IPV) vaccine, mixed with the Haemophilus influenzae type b (Hib) conjugate vaccine and administered as a single injection, with the DTPa-IPV/Hib and hepatitis B vaccines administered in two simultaneous injections to infants at 2, 4 and 6 months of age*. Vaccine 2003; 21: 3593-600.
244. Zepp F, Knuf M, Heininger U, et al. *Safety, reactogenicity and immunogenicity of a combined hexavalent tetanus, diphtheria, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated poliovirus vaccine and Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine, for primary immunization of infants*. Vaccine 2004; 22: 2226-33.
245. WHO - Weekly epidemiological record, No. 40, 2 october 2009 - Hepatitis B vaccines: WHO position paper. <http://www.who.int/wer/2009/wer8440.pdf>.
246. Poland GA, Jacobson RM. *Clinical practice: prevention of hepatitis B with the hepatitis B vaccine*. N Engl J Med 2004; 351: 2832-38.
247. Kao JH. *Hepatitis B vaccination and prevention of hepatocellular carcinoma*. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2015; 29: 907-17.
248. Yerushalmi B, Raz R, Blondheim O, et al. *Safety and immunogenicity of a novel mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing Pre-S1 and Pre-S2 antigens in neonates*. Pediatr Infect Dis J 1997; 16: 587-92.
249. Jones CD, Page M, Bacon A, et al. *T-cell and antibody response characterisation of a new recombinant pre-S1, pre-S2 and SHBs antigen-containing hepatitis B vaccine; demonstration of superior anti-SHBs antibody induction in responder mice*. Vaccine 1999; 17: 2528-37.
250. Shouval D, Roggendorf H, Roggendorf M. *Enhanced immune response to hepatitis B vaccination through immunization with a Pre-S1/Pre-S2/S vaccine*. Med Microbiol Immunol 2015; 204: 57-68.

251. Zipp F, Weil JG, Einhaupl KM. *No increase in demyelinating diseases after hepatitis B vaccination*. Nat Med 1999; 5: 964-65.
252. Sadovnick AD, Scheifele DW. *School-based hepatitis B vaccination programme and adolescent multiple sclerosis*. Lancet 2000; 355: 549-50.
253. Ascherio A, Zhang S, Hernan M, et al. *Hepatitis B vaccination and the risk of multiple sclerosis*. N Engl J Med 2001; 344: 327-32.
254. Confavreux C, Suissa S, Saddier P, et al. *Vaccination and the risk of relapse in multiple sclerosis*. N Engl J Med 2001; 344: 319-26.
255. Duclos P. *Safety of immunization and adverse events following vaccination against hepatitis B*. J Hepatol 2003; 39: S83-88.
256. Hernàn MA, Jick SS, Olek MJ, et al. *Recombinant hepatitis B vaccine and the risk of multiple sclerosis. A prospective study*. Neurology 2004; 63: 838-42.
257. Naismith RT, Cross AH. *Does the hepatitis B vaccine cause multiple sclerosis?* Neurology 2004; 63: 772-73.
258. Mikaeloff Y, Caridade G, Suissa S, et al. *Hepatitis B vaccine and the risk of CNS inflammatory demyelination in childhood*. Neurology 2009; 72: 873-80.
259. Greenberg DP, Vadheim CM, Marcy SM, et al. *Safety and immunogenicity of a recombinant hepatitis B vaccine administered to infants at 2, 4 and 6 months of age. The Kaiser-UCLA Vaccine Study Group*. Vaccine 1996; 14: 811-16.
260. Duval B, Boulianne N, De Serres G, et al. *Comparative immunogenicity under field conditions of two recombinant hepatitis B vaccines in 8-10-year-old children*. Vaccine 2000; 18: 1467-72.
261. Michel ML, Tiollais P. *Hepatitis B vaccines: protective efficacy and therapeutic potential*. Pathol Biol (Paris) 2010; 58: 288-95.
262. Hollinger FB. *Factors influencing the immune response to hepatitis B vaccine, booster dose guidelines, and vaccine protocol recommendations*. Am J Med 1989; 87: 36S-40S.
263. Ryckman KK, Fielding K, Hill AV, et al. *Host genetic factors and vaccine-induced immunity to HBV infection: haplotype analysis*. PLoS One 2010; 5: e12273.
264. Yang S, Tian G, Cui Y, et al. *Factors influencing immunologic response to hepatitis B vaccine in adults*. Sci Rep 2016; 6: 27251.
265. Potsch DV, Oliveira ML, Ginuino C, et al. *High rates of serological response to a modified hepatitis B vaccination schedule in HIV-infected adults subjects*. Vaccine 2010; 28: 1447-50.
266. Ramezani A, Eslamifar A, Banifazl M, et al. *Efficacy and long-term immunogenicity of hepatitis B vaccine in haemodialysis patients*. Int J Clin Pract 2009; 63: 394-97.
267. Das K, Gupta RK, Kumar V, et al. *Immunogenicity and reactogenicity of a recombinant hepatitis B vaccine in subjects over age of forty years and response of a booster dose among nonresponders*. World J Gastroenterol 2003; 9: 1132-34.

268. Chaves SS, Daniels D, Cooper BW, et al. *Immunogenicity of hepatitis B vaccine among hemodialysis patients: effect of revaccination of non-responders and duration of protection*. *Vaccine* 2011; 29: 9618-23.
269. Vitaliti G, Praticò AD, Cimino C, et al. *Hepatitis B vaccine in celiac disease: yesterday, today and tomorrow*. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 838-45.
270. Thoelen S, De Clercq N, Tornieporth N. *A prophylactic hepatitis B vaccine with a novel adjuvant system*. *Vaccine* 2001; 19: 2400-03.
271. Jacques P, Moens G, Desombere I, et al. *The immunogenicity and reactogenicity profile of a candidate hepatitis B vaccine in an adult vaccine non-responder population*. *Vaccine* 2002; 20: 3644-49.
272. Fabrizi F, Tarantino A, Castelnovo C, et al. *Recombinant Hepatitis B Vaccine Adjuvanted With AS04 in Dialysis Patients: A Prospective Cohort Study*. *Kidney Blood Press Res* 2015; 40: 584-92.
273. Haubitz M, Ehlerding G, Beigel A, et al. *Clinical experience with a new recombinant hepatitis-B vaccine in previous non-responders with chronic renal insufficiency*. *Clin Nephrol* 1996; 45: 180-82.
274. Weinstein T, Chagnac A, Boaz M, et al. *Improved immunogenicity of a novel third-generation recombinant hepatitis B vaccine in patients with end-stage renal disease*. *Nephron Clin Pract* 2004; 97: c67-72.
275. Rendi-Wagner P, Shouval D, Genton B, et al. *Comparative immunogenicity of a PreS/S hepatitis B vaccine in non- and low responders to conventional vaccine*. *Vaccine* 2006; 24: 2781-89.
276. Krawczyk A, Ludwig C, Jochum C, et al. *Induction of a robust T- and B-cell immune response in non- and low-responders to conventional vaccination against hepatitis B by using a third generation PreS/S vaccine*. *Vaccine* 2014; 32: 5077-82.
277. Jilg W, Schmidt M, Deinhardt F. *Persistence of specific antibodies after hepatitis B vaccination*. *J Hepatol* 1988; 6: 201-07.
278. Ayerbe MC, Pérez-Rivilla A, ICOVAHB group. *Assessment of long-term efficacy of hepatitis B vaccine*. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 150-56.
279. Floreani A, Baldo V, Cristofolletti M, et al. *Long-term persistence of anti-HBs after vaccination against HBV: an 18 year experience in health care workers*. *Vaccine* 2004; 22: 607-10.
280. Duval B, Gilca V, Boulianne N, et al. *Comparative long term immunogenicity of two recombinant hepatitis B vaccines and the effect of a booster dose given after five years in a low endemicity country*. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 213-18.
281. McMahon BJ, Bruden DL, Petersen KM. *Antibody levels and protection after hepatitis B vaccination: results of a 15-year follow-up*. *Ann Intern Med* 2005; 142: 333-41.
282. Gabbuti A, Romanò L, Blanc P, et al. *Long-term immunogenicity of hepatitis B vaccination in a cohort of Italian healthy adolescents*. *Vaccine* 2007; 25: 3129-32.
283. European Consensus Group on Hepatitis B immunity. *Are booster immunisations needed for lifelong hepatitis B immunity?* *Lancet* 2000; 355: 561-65.
284. Banatvala J, Van Damme P, Oehen S. *Lifelong protection against hepatitis B: the role of vaccine immunogenicity in immune memory*. *Vaccine* 2001; 19: 877-85.

285. Bauer T, Jilg W. *Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination*. *Vaccine* 2006; 24: 572-77.
286. Carollo M, Palazzo R, Bianco M, et al. *Hepatitis B specific T cell immunity induced by primary vaccination persists independently of the protective serum antibody level*. *Vaccine* 2013; 31: 506-13.
287. McMahon BJ, Bulkow LR, Singleton RJ, et al. *Elimination of hepatocellular carcinoma and acute hepatitis B in children 25 years after a hepatitis B newborn and catch-up immunization program*. *Hepatology* 2011; 54: 801-07.
288. Peto TJ, Mendy ME, Lowe Y et al. *Efficacy and effectiveness of infant vaccination against chronic hepatitis B in the Gambia Hepatitis Intervention Study (1986–90) and in the nationwide immunisation program*. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 7.
289. Bruce MG, Bruden D, Hurlburt D, et al. *Antibody levels and protection after hepatitis B vaccine: results of a 30-year follow-up study and response to a booster dose*. *J Infect Dis* 2016; 214: 16-22.
290. Ni YH, Chang MH, Jan CF, et al. *Continuing Decrease in Hepatitis B Virus Infection 30 Years After Initiation of Infant Vaccination Program in Taiwan*. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14: 1324-30.
291. Bialek SR, Bower WA, Novak R, et al. *Persistence of protection against hepatitis B virus infection among adolescents vaccinated with recombinant hepatitis B vaccine beginning at birth: a 15-year follow-up study*. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27: 881-85.
292. Lu CY, Ni YH, Chiang BL, et al. *Humoral and cellular immune responses to a hepatitis B vaccine booster 15-18 years after neonatal immunization*. *J Infect Dis* 2008; 197: 1419-26.
293. Su FH, Chen JD, Cheng SH, et al. *Waning-off effect of serum hepatitis B surface antibody amongst Taiwanese university students: 18 years post-implementation of Taiwan's national hepatitis B vaccination programme*. *J Viral Hepat* 2008; 15: 14-19.
294. Jan CF, Huang KC, Chien YC, et al. *Determination of immune memory to hepatitis B vaccination through early booster response in college students*. *Hepatology* 2010; 51: 1547-54.
295. Lin CC, Yang CY, Shih CT, et al. *Waning immunity and booster responses in nursing and medical technology students who had received plasma-derived or recombinant hepatitis B vaccine during infancy*. *Am J Infect Control* 2011; 39: 408-14.
296. Wu TW, Lin HH, Wang LY. *Chronic hepatitis B infection in adolescents who received primary infantile vaccination*. *Hepatology* 2013; 57: 37-45.
297. Mallet E, Fabre P, Pines E, et al. *Immunogenicity and safety of a new liquid hexavalent combined vaccine compared with separate administration of reference licensed vaccines in infants*. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 1119-27.
298. Liese JG, Stojanov S, Berut F, et al. *Large scale safety study of a liquid hexavalent vaccine (D-T-acP-IPV-PRP--T-HBs) administered at 2, 4, 6 and 12-14 months of age*. *Vaccine* 2001; 20: 448-54.
299. Tichmann I, Preidel H, Grunert D, et al. *Comparison of the immunogenicity and reactogenicity of two commercially available hexavalent vaccines administered as a primary vaccination course at 2, 4 and 6 months of age*. *Vaccine* 2005; 23: 3272-79.

300. Olivier C, Belohradsky BH, Stojanov S, et al. *Immunogenicity, reactogenicity, and safety of a seven-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) concurrently administered with a fully liquid DTPa-IPV-HBV-Hib combination vaccine in healthy infants.* Vaccine 2008; 26: 3142-52.
301. Kilpi TM, Silfverdal SA, Nilsson L, et al. *Immunogenicity and reactogenicity of two diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B-inactivated polio virus-Haemophilus influenzae type b vaccines administered at 3, 5 and 11-12 months of age.* Hum Vaccin 2009; 5: 18-25.
302. Van Der Meeren O, Kuriyakose S, Kolhe D, et al. *Immunogenicity of Infanrix™ hexa administered at 3, 5 and 11 months of age.* Vaccine 2012; 30: 2710-14.
303. European Medicines Agency. Scientific conclusions and grounds for the suspension of the marketing authorisation of Hexavac presented by the EMEA.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Conclusion/human/000298/WC500074684.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Conclusion/human/000298/WC500074684.pdf)
304. Agenzia Italiana del Farmaco. Indicazioni nazionali in seguito alla raccomandazione EMEA sul vaccino Hexavac.  
[http://www.agenziafarmaco.gov.it/wscs\\_render\\_attachment\\_by\\_id/111.96280.1138871007994098e.pdf?id=111.96286.1118871008131](http://www.agenziafarmaco.gov.it/wscs_render_attachment_by_id/111.96280.1138871007994098e.pdf?id=111.96286.1118871008131)
305. Hexavac [diphtheria, tetanus, acellular pertussis, inactivated poliomyelitis, hepatitis b (recombinant) and haemophilus influenzae type b conjugate vaccine, adjuvanted] Withdrawal of marketing authorisation in the European Union.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Public\\_statement/2012/08/WC500130968.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2012/08/WC500130968.pdf)
306. Alter MJ, Hadler SC, Margolis HS, et al. *The changing epidemiology of hepatitis B in the United States. Need for alternative vaccination strategies.* JAMA 1990; 263: 1218-22.
307. Gully PR. *Selective risk group strategies in North America.* Vaccine 1995; 13: S41-43.
308. Jilg W. *Selective risk group strategies in Europe.* Vaccine 1995; 13: S44-46.
309. Kane M. *Global programme for control of hepatitis B infection.* Vaccine 1995; 13: S47-49.
310. Van Damme P, Kane M, Meheus A. *Integration of hepatitis B vaccination into national immunisation programmes.* Viral Hepatitis Prevention Board. BMJ 1997; 314: 1033-36.
311. World Health Organization.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs378/en/> -  
aggiornato settembre 2016 - ultimo accesso dicembre 2016.
312. Huang K, Lin S. *Nationwide vaccination: a success story in Taiwan.* Vaccine 2000; 18: S35-38.
313. Hsu HY, Chang MH, Chen DS, et al. *Baseline seroepidemiology of hepatitis B virus infection in children in Taipei, 1984: a study just before mass hepatitis B vaccination program in Taiwan.* J Med Virol 1986; 18: 301-07.
314. Tsen YJ, Chang MH, Hsu HY, et al. *Seroprevalence of hepatitis B virus infection in children in Taipei, 1989: five years after a mass hepatitis B vaccination program.* J Med Virol 1991; 34: 96-99.
315. Chen HL, Chang MH, Ni YH, et al. *Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in children: Ten years of mass vaccination in Taiwan.* JAMA 1996; 276: 906-08.

316. Ni YH, Huang LM, Chang MH, et al. *Two decades of universal hepatitis B vaccination in taiwan: impact and implication for future strategies*. *Gastroenterology* 2007; 132: 1287-93.
317. Ni YH, Chang MH, Wu JF, et al. *Minimization of hepatitis B infection by a 25-year universal vaccination program*. *J Hepatol* 2012; 57: 730-35.
318. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, et al. *Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group*. *N Engl J Med* 1997; 336: 1855-59.
319. Chang MH, You SL, Chen CJ, et al. *Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study*. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 1348-55.
320. Chien YC, Jan CF, Chiang CJ, et al. *Incomplete hepatitis B immunization, maternal carrier status, and increased risk of liver diseases: a 20-year cohort study of 3.8 million vaccinees*. *Hepatology* 2014; 60: 125-32.
321. Viviania S, Jacka A, Hallc AJ, et al. *Hepatitis B vaccination in infancy in The Gambia: protection: against carriage at 9 years of age*. *Vaccine* 1999; 17: 2946-50.
322. van der Sande MA, Waight P, Mendy M, et al. *Long-term protection against carriage of hepatitis B virus after infant vaccination*. *J Infect Dis* 2006; 193: 1528-35.
323. Ng KP, Saw TL, Baki A, et al. *Impact of the Expanded Program of Immunization against hepatitis B infection in school children in Malaysia*. *Med Microbiol Immunol* 2005; 194: 163-68.
324. Ng KP, Ngeow YF. *Hepatitis B seroprevalence among University of Malaya Students in the Post-universal Infant Vaccination Era*. *Med J Malaysia* 2013; 68: 144-47.
325. Perz JF, Elm JL, Fiore AE, et al. *Near elimination of hepatitis B infections among Hawaii elementary school children after universal infant hepatitis B vaccination*. *Pediatrics* 2006; 118: 1403-08.
326. Bergamini F, Zanetti AR, Ferroni P, et al. *Immune response to hepatitis B vaccine in staff and patients in renal dialysis units*. *J Infect* 1983; 7: 35-40.
327. DECRETO 22 dicembre 1988. Offerta gratuita di vaccino anti-epatite B alle categorie a rischio (GU Serie Generale n.305 del 30-12-1988).  
<http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1988/12/30/088A5185/sg>
328. LEGGE 27 maggio 1991, n. 165. Obbligatorietà della vaccinazione contro l'epatite virale B. (GU Serie Generale n.127 del 1-6-1991).  
[http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1991/06/01/091G0201/sg;jsessionid=oNAcrH7DzVR98m+VinQGaQ\\_.ntc-as2-guri2a](http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1991/06/01/091G0201/sg;jsessionid=oNAcrH7DzVR98m+VinQGaQ_.ntc-as2-guri2a)
329. Zanetti AR, Tanzi E, Romanò L, et al. *Vaccination against hepatitis B: the Italian strategy*. *Vaccine* 1993; 11: 521-24.
330. Decreto 20 novembre 2000. Aggiornamento del protocollo per l'esecuzione della vaccinazione contro l'epatite virale B.  
[http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_normativa\\_1516\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_normativa_1516_allegato.pdf)
331. Da Villa G, Romanò L, Sepe A, et al. *Impact of hepatitis B vaccination in a highly endemic area of south Italy and long-term duration of anti-HBs antibody in two cohorts of vaccinated individuals*. *Vaccine* 2007; 25: 3133-36.



332. Mele A, Tosti ME, Mariano A, et al. *Acute hepatitis B 14 years after the implementation of universal vaccination in Italy: areas of improvement and emerging challenges*. Clin Infect Dis 2008; 46: 868-75.
333. De Paschale M, Manco MT, Belvisi L, et al. *Prevalence of markers of hepatitis B virus infection or vaccination in HBsAg-negative subjects*. Blood Transfus 2012; 10: 344-50.
334. Stroffolini T, Guadagnino V, Rapicetta M, et al. *The impact of a vaccination campaign against hepatitis B on the further decrease of hepatitis B virus infection in a southern Italian town over 14 years*. Eur J Intern Med 2012; 23: e190-92.
335. Boccalini S, Pellegrino E, Tiscione E, et al. *Sero-epidemiology of hepatitis B markers in the population of Tuscany, Central Italy, 20 years after the implementation of universal vaccination*. Hum Vaccin Immunother 2013; 9: 636-41.
336. Sagnelli E, Sagnelli C, Pisaturo M, et al. *Epidemiology of acute and chronic hepatitis B and delta over the last 5 decades in Italy*. World J Gastroenterol 2014; 20: 7635-43.
337. Boccalini S, Taddei C, Ceccherini V, et al. *Economic analysis of the first 20 years of universal hepatitis B vaccination program in Italy: an a posteriori evaluation and forecast of future benefits*. Hum Vaccin Immunother 2013; 9: 1119-28.
338. Assad S, Francis A. *Over a decade of experience with a yeast recombinant hepatitis B vaccine*. Vaccine 1999; 18: 57-67.
339. Keating GM, Noble S. *Recombinant hepatitis B vaccine (Engerix-B): a review of its immunogenicity and protective efficacy against hepatitis B*. Drugs 2003; 63: 1021-51.
340. Venters C, Graham W, Cassidy W. *Recombivax-HB: perspectives past, present and future*. Expert Rev Vaccines 2004; 3: 119-29.
341. Behre U, Bleckmann G, Crasta PD, et al. *Long-term anti-HBs antibody persistence and immune memory in children and adolescents who received routine childhood hepatitis B vaccination*. Hum Vaccin Immunother 2012; 8: 813-18.
342. Anderson CL, Remschmidt C, Drobnitzky FP, et al. *Hepatitis B immune status in adolescents vaccinated during infancy: A retrospective cohort study from a pediatric practice in Germany*. Hum Vaccin Immunother 2016; 12: 779-84.
343. Van Damme P. *Long-term protection after hepatitis B vaccine*. J Infect Dis 2016; 214: 1-3.
344. Lu JJ, Chen CC, Chou SM, et al. *Hepatitis B immunity in adolescents and necessity for boost vaccination: 23 years after nationwide hepatitis B virus vaccination program in Taiwan*. Vaccine 2009; 27: 6613-18.
345. Poovorawan Y, Chongsrisawat V, Theamboonlers A, et al. *Persistence of antibodies and immune memory to hepatitis B vaccine 20 years after infant vaccination in Thailand*. Vaccine 2010; 28: 730-36.
346. Mendy M, Peterson I, Hossin S, et al. *Observational study of vaccine efficacy 24 years after the start of hepatitis B vaccination in two Gambian villages: no need for a booster dose*. Plos One 2013; 8: e58029.
347. Zanetti AR, Romanò L, Giambi C, et al. *Hepatitis B immune memory in children primed with hexavalent vaccines and given monovalent booster vaccines: an open-label, randomised, controlled, multicentre study*. Lancet Infect Dis 2010; 10: 755-61.

348. Margolis HS, Coleman PJ, Brown RE, et al. *Prevention of hepatitis B virus transmission by immunization. An economic analysis of current recommendations*. JAMA 1995; 274: 1201-08.
349. Ministero della Salute. Vaccinazioni dell'età pediatrica. Coperture vaccinali. [http://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6\\_2\\_8\\_3\\_1.jsp?id=20](http://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_8_3_1.jsp?id=20) - aggiornato novembre 2016 - ultimo accesso dicembre 2016.
350. Mele A, Rosmini F, Zampieri A, et al. *Integrated epidemiological system for acute viral hepatitis in Italy (SEIEVA): description and preliminary results*. Eur J Epidemiol 1986; 2: 300-04.
351. Tosti ME, Longhi S, de Waure C, et al. *Assessment of timeliness, representativeness and quality of data reported to Italy's national integrated surveillance system for acute viral hepatitis (SEIEVA)*. Public Health 2015; 129: 561-68.
352. Chemin I, Zoulim F, Merle P, et al. *High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology*. J Hepatol 2001; 34: 447-54.
353. Mizokami M, Nakano T, Orito E, et al. *Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns*. FEBS Lett 1999; 450: 66-71.
354. GenBank – NCBI  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
355. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. *The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. Nucleic Acids Res 1997; 25: 4876-82.
356. Kimura M. *A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences*. J of Molecular Evolution 1980; 16: 111-20.
357. Saitou N, Nei M. *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol Biol Evol 1987; 4: 406-25.
358. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*. Mol Biol Evol 2011; 28: 2731-39.
359. Coppola N, Corvino AR, De Pascalis S, et al. *The long-term immunogenicity of recombinant hepatitis B virus (HBV) vaccine: contribution of universal HBV vaccination in Italy*. BMC Infect Dis 2015; 15: 149.
360. Spada E, Romanò L, Tosti ME, et al. *Hepatitis B immunity in teenagers vaccinated as infants: an Italian 17-year follow-up study*. Clin Microbiol Infect 2014; 20: O680-86.
361. Chaouch H, Hachfi W, Fodha I, et al. *Impact and long-term protection of hepatitis B vaccination: 17 years after universal hepatitis B vaccination in Tunisia*. Epidemiol Infect 2016; 18: 1-11.
362. Su FH, Cheng SH, Chung YL, et al. *Hepatitis B seroprevalence and anamnestic response amongst Taiwanese young adults with full vaccination in infancy, 20 years subsequent to national hepatitis B vaccination*. Vaccine 2007; 25: 8085-90.
363. Wang ZZ, Gao YH, Lu W, et al. *Long-term persistence in protection and response to a hepatitis B vaccine booster among adolescents immunized in infancy in the western region of China*. Hum Vaccin Immunother 2016. Doi: 10.1080/21645515.2016.1250990.

364. Bagheri-Jamebozorgi M, Keshavarz J, Nemati M, et al. *The persistence of anti-HBs antibody and anamnestic response 20 years after primary vaccination with recombinant hepatitis B vaccine at infancy*. Hum Vaccin Immunother 2014; 10: 3731-36.
365. Saffar H, Saffar MJ, Ajami A, et al. *Long-term T-cell-mediated immunologic memory to hepatitis B vaccine in young adults following neonatal vaccination*. Hepat Mon 2014; 14: e22223.
366. Middleman AB, Baker CJ, Kozinetz CA, et al. *Duration of protection after infant hepatitis B vaccination series*. Pediatrics 2014; 133: e1500-07.
367. Zanetti AR, Mariano A, Romanò L, et al. *Long-term immunogenicity of hepatitis B vaccination and policy for booster: an Italian multicentre study*. Lancet 2005; 366: 1379-84.
368. Stroffolini T, Guadagnino B, Caroleo G, et al. *Long-term immunogenicity of hepatitis B vaccination in children and adolescents in a southern Italian town*. Infection 2012; 40: 299-302.
369. Chiara F, Battista Bartolucci G, Cattai M, et al. *Hepatitis B vaccination of adolescents: significance of non-protective antibodies*. Vaccine 2014; 32: 62-68.
370. Spradling PR, Xing J, Williams R, et al. *Immunity to hepatitis B virus (HBV) infection two decades after implementation of universal infant HBV vaccination: association of detectable residual antibodies and response to a single HBV challenge dose*. Clin Vaccine Immunol 2013; 20: 559-61.
371. Spradling PR, Kamili S, Xing J, et al. *Response to challenge dose among young adults vaccinated for hepatitis B as infants: importance of detectable residual antibody to hepatitis B surface antigen*. Infect Control Hosp Epidemiol 2015; 36: 529-33.
372. Brunskole Hummel I, Huber B, Wenzel JJ, et al. *Markers of Protection in Children and Adolescents Six to Fourteen Years After Primary Hepatitis B Vaccination in Real Life: A Pilot Study*. Pediatr Infect Dis J 2016; 35: 286-91.
373. Van Der Meer O, Behre U, Crasta P. *Immunity to hepatitis B persists in adolescents 15-16 years of age vaccinated in infancy with three doses of hepatitis B vaccine*. Vaccine 2016; 34: 2745-49.
374. Su FH, Bai CH, Chu FY, et al. *Significance and anamnestic response in isolated hepatitis B core antibody-positive individuals 18 years after neonatal hepatitis B virus vaccination in Taiwan*. Vaccine 2012; 30: 4034-39.
375. Zanetti A, Parlato A, Romanò L, et al. *Challenge with a hepatitis B vaccine in two cohorts of 4-7-year-old children primed with hexavalent vaccines: an open-label, randomised trial in Italy*. Vaccine 2012; 30: 5770-75.
376. Mosley JW, Stevens CE, Aach RD, et al. *Donor screening for antibody to hepatitis B core antigen and hepatitis B virus infection in transfusion recipients*. Transfusion 1995; 35: 5-12.
377. Hennig H, Puchta I, Luhm J, et al. *Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen*. Blood 2002; 100: 2637-41.
378. Kleinman SH, Kuhns MC, Todd DS, et al. *Frequency of HBV DNA detection in US blood donors testing positive for the presence of anti-HBc: implications for transfusion transmission and donor screening*. Transfusion 2003; 43: 696-704.
379. Schmidt M, Nubling CM, Scheiblaue H, et al. *Anti-HBc screening of blood donors: a comparison of nine anti-HBc tests*. Vox Sang 2006; 91: 237-43.

380. Campagna M, Siddu A, Meloni A, et al. *Epidemiological impact of mandatory vaccination against hepatitis B in Italian young adults*. *Hepat Mon* 2011; 11: 750-52.
381. Agenzia Italiana del Farmaco. Sospeso dal commercio vaccino esavalente Hexavac. <http://www.agenziafarmaco.gov.it/sites/default/files/comunicatistampa/cs16.pdf>
382. Giambi C, Bella A, Barale A, et al. *A cohort study to evaluate persistence of hepatitis B immunogenicity after administration of hexavalent vaccines*. *BMC Infect Dis* 2008; 8: 100.
383. Jorgensen P, Poethko-Müller C, Hellenbrand W, et al. *Low hepatitis B immunogenicity of a hexavalent vaccine widely used in Germany: results of the German Health Survey for Children and Adolescents, 2003-2006*. *Epidemiol Infect* 2010; 138: 1621-29.
384. Rosado MM, Scarsella M, Pandolfi E, et al. *Switched memory B cells maintain specific memory independently of serum antibodies: the hepatitis B example*. *Eur J Immunol* 2011; 41: 1800-08.
385. Avdicova M, Crasta PD, Hardt K, et al. *Lasting immune memory against hepatitis B following challenge 10-11 years after primary vaccination with either three doses of hexavalent DTPa-HBV-IPV/Hib or monovalent hepatitis B vaccine at 3, 5 and 11-12 months of age*. *Vaccine* 2015; 33: 2727-33.
386. Geier DA, Geier MR. *A case-control study of serious autoimmune adverse events following hepatitis B immunization*. *Autoimmunity* 2005; 38: 295-301.
387. Mikaeloff Y, Caridade G, Assi S, et al. *Hepatitis B vaccine and risk of relapse after a first childhood episode of CNS inflammatory demyelination*. *Brain* 2007; 130: 1105-10.
388. DeStefano F, Verstraeten T, Jackson LA, et al. *Vaccinations and risk of central nervous system demyelinating diseases in adults*. *Arch Neurol* 2003; 60: 504-09.
389. Ozakbas S, Idiman E, Yulug B, et al. *Development of multiple sclerosis after vaccination against hepatitis B: a study based on human leucocyte antigen haplotypes*. *Tissue Antigens* 2006; 68: 235-38.
390. Mikaeloff Y, Caridade G, Rossier M, et al. *Hepatitis B vaccination and the risk of childhood-onset multiple sclerosis*. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007; 161: 1176-82.
391. Langer-Gould A, Qian L, Tartof SY, et al. *Vaccines and the risk of multiple sclerosis and other central nervous system demyelinating diseases*. *JAMA Neurol* 2014; 71: 1506-13.
392. Reinert P, Cinquetti S, Soubeyrand B, et al. *Challenge with hepatitis B vaccine in children previously vaccinated with a hepatitis B-containing combination vaccine*. *Adv Ther* 2010; 27: 28-38.
393. Zanetti AR. *Update on hepatitis B vaccination in Italy 10 years after its implementation*. *Vaccine* 2001; 19: 2380-83.
394. Sagnelli C, Ciccozzi M, Pisaturo M, et al. *The impact of viral molecular diversity on the clinical presentation and outcome of acute hepatitis B in Italy*. *New Microbiol* 2015; 38: 137-47.
395. Sagnelli C, Ciccozzi M, Pisaturo M, et al. *Molecular epidemiology of hepatitis B virus genotypes circulating in acute hepatitis B patients in the Campania region*. *J Med Virol* 2014; 86: 1683-93.
396. Zuccaro O, Romanò L, Mele A, et al. *Clinical, epidemiological and virological features of acute hepatitis B in Italy*. *Infection* 2015; 43: 431-41.

397. Scalia G, Russo R, Palermo I, et al. *Clinical, virological and epidemiological aspects of acute B hepatitis in the Catania area (Italy)*. Infez Med 2010; 18: 169-74.
398. Pollicita M, Alteri C, Bellocchi MC, et al. *A recent epidemiological cluster of acute hepatitis B genotype F1b infection in a restricted geographical area of Italy*. Clin Microbiol Infect 2015; 21: 1124.
399. Tacke F, Amini-Bavil-Olyae S, Heim A, et al. *Acute hepatitis B virus infection by genotype F despite successful vaccination in an immune-competent German patient*. J Clin Virol 2007; 38: 353-57.
400. Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, et al. *Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F*. J Infect Dis 2007; 195: 5-11.
401. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. *Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus*. Hepatol Res 2010; 40: 14-30.
402. Protzer-Knolle U, Naumann U, Bartenschlager R, et al. *Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation*. Hepatology 1998; 27: 254-63.
403. Nainan OV, Khristova ML, Byun K, et al. *Genetic variation of hepatitis B surface antigen coding region among infants with chronic hepatitis B virus infection*. J Med Virol 2002; 68: 319-27.
404. Ma Q, Wang Y. *Comprehensive analysis of the prevalence of hepatitis B virus escape mutations in the major hydrophilic region of surface antigen*. J Med Virol 2012; 84: 198-206.
405. Dong Y, Liu SL, Zhai XJ, et al. *A serological and molecular survey of hepatitis B in children 15 years after inception of the national hepatitis B vaccination program in eastern China*. J Med Virol 2009; 81: 1517-24.
406. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, et al. *No increase in prevalence of hepatitis B surface antigen mutant in a population of children and adolescents who were fully covered by universal infant immunization*. J Infect Dis 2010; 201: 1192-200.
407. Komatsu H, Inui A, Umetsu S, et al. *Evaluation of the G145R Mutant of the Hepatitis B Virus as a Minor Strain in Mother-to-Child Transmission*. PLoS One 2016; 11: e0165674.
408. Hu LP, Liu DP, Chen QY, et al. *Occult HBV Infection May Be Transmitted through Close Contact and Manifest as an Overt Infection*. PLoS One 2015; 10: e0138552.
409. Kfoury Baz EM, Zheng J, Mazuruk K, et al. *Characterization of a novel hepatitis B virus mutant: demonstration of mutation-induced hepatitis B virus surface antigen group specific "a" determinant conformation change and its application in diagnostic assays*. Transfus Med 2001; 11: 355-62.
410. Torresi J. *The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus*. J Clin Virol 2002; 25: 97-106.
411. Lazarevic I. *Clinical implications of hepatitis B virus mutations: recent advances*. World J Gastroenterol 2014; 20: 7653-64.
412. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, et al. *Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis*. Hepatology 1997; 26: 786-91.
413. Chiou HL, Lee TS, Kuo J, et al. *Altered antigenicity of 'a' determinant variants of hepatitis B virus*. J Gen Virol 1997; 78: 2639-45.

414. Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK. *Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants*. J Med Virol 1999; 59: 19-24.
415. Mendy M, D'Mello F, Kanellos T, et al. *Envelope protein variability among HBV-Infected asymptomatic carriers and immunized children with breakthrough infections*. J Med Virol 2008; 80: 1537-46.
416. Luongo M, Critelli R, Grottola A, et al. *Acute hepatitis B caused by a vaccine-escape HBV strain in vaccinated subject: sequence analysis and therapeutic strategy*. J Clin Virol 2015; 62: 89-91.
417. Golsaz-Shirazi F, Mohammadi H, Amiri MM, et al. *Localization of immunodominant epitopes within the "a" determinant of hepatitis B surface antigen using monoclonal antibodies*. Arch Virol 2016; 161: 2765-72.
418. Ghany MG, Ayola B, Villamil FG, et al. *Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis*. Hepatology 1998; 27: 213-22.
419. Kim KH, Lee KH, Chang HY, et al. *Evolution of hepatitis B virus sequence from a liver transplant recipient with rapid breakthrough despite hepatitis B immune globulin prophylaxis and lamivudine therapy*. J Med Virol 2003; 71: 367-75.
420. Kim KH, Chang HY, Park JY, et al. *Spontaneous HBsAg loss in Korean patients: relevance of viral genotypes, S gene mutations, and covalently closed circular DNA copy numbers*. Clin Mol Hepatol 2014; 20: 251-60.
421. Ie SI, Thedja MD, Roni M, et al. *Prediction of conformational changes by single mutation in the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) identified in HBsAg-negative blood donors*. Virol J 2010; 7: 326.
422. Thedja MD, Roni M, Harahap AR, et al. *Occult hepatitis B in blood donors in Indonesia: altered antigenicity of the hepatitis B virus surface protein*. Hepatol Int 2010; 4: 608-14.
423. Shimakawa Y, Yan HJ, Tsuchiya N, et al. *Association of early age at establishment of chronic hepatitis B infection with persistent viral replication, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a systematic review*. PLoS One 2013; 8: e69430.