

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Progetto n°3: Fisiologia Applicata e Fisiopatologia

Ciclo XXIII

Settore/i scientifico-disciplinare/i di afferenza: BIO\09

**INFEZIONE OCCULTA DA VIRUS B: ASPETTI
VIROLOGICI E IMMUNOLOGICI**

**PRESENTATA DA
Dott.ssa CAMILLA GRANIERI**

**Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof.
Lucio Ildebrando Cocco**

**Relatore
Dr.ssa
Annagiulia Gramenzi**

ESAME FINALE ANNO 2011

INDICE

1. INTRODUZIONE e BACKGROUND	
1.1 Cenni sull'infezione da Virus B	Pag 4
1.2 Che cos'è l'infezione occulta da virus B (OBI)	Pag 5
• OBI e riattivazione	Pag 10
• OBI e trasfusione	Pag 10
• OBI e HCC	Pag 12
• OBI e progressione della malattia epatica	Pag 14
• OBI e HCV	Pag 15
1.3 NASH e NAFLD	Pag 16
• NASH e HCV	Pag 17
• NASH e fattori dell'ospite	Pag 17
• NASH e fisiopatologia	Pag 18
• NASH e HBV	Pag 18
1.4 Epatopatie ad eziologia criptogenetica	Pag 19
2. OBIETTIVO	
3. MATERIALI e METODI	
3.1 Popolazione in studio	Pag 23
3.2 Valutazione virologica	Pag 23
• Estrazione di acidi nucleici totali da siero o plasma EDTA	Pag 24
• Estrazione di acidi nucleici totali da biopsia epatica	Pag 25
• Metodica di amplificazione della regione S di HBV	Pag 26
• Metodica di amplificazione della regione pre-core/core di HBV	Pag 27
• Metodica di amplificazione della regione X di HBV	Pag 28
• Metodica di amplificazione della regione PreS1/S2 di HBV	Pag 29
• Metodica di amplificazione GAPDH	Pag 30
• Analisi di sequenza	Pag 31
3.3 Valutazione Immunologica	
• Isolamento di cellule mononucleate	Pag 32
• Generazione delle linee HBV-specifiche	Pag 33

• Elispot con peptidi sintetici HBV-specifici	Pag 34
3.4 Analisi statistica	Pag 35
4. RISULTATI	
4.1 Risultati virologici	Pag 37
• Amplificazione delle regioni di HBV	Pag 37
• Analisi di sequenza	Pag 41
4.2 Dati Biochimici e Demografici	Pag 46
• Parametri clinici e demografici OBI vs nonOBI e HCV/OBI vs HCV/nonOBI	Pag 47
4.3 Risultati Immunologici	Pag 49
5. DISCUSSIONE	Pag 41
BIBLIOGRAFIA	Pag 54

1. INTRODUZIONE e BACKGROUND

1.1 *Cenni sull'Infezione da Virus B*

L'infezione da Virus dell'Epatite B e l'infezione da Virus dell'epatite C (HBV, HCV) sono insieme, al secondo posto dopo quella da HIV, tra le cause di mortalità dovuta ad infezioni di natura virale. Le patologie HBV-relate sono principalmente causate dall'effetto citotossico dovuto alla risposta immunitaria. Il decorso dell'infezione HBV è altamente variabile e va da un tipo di infezione silente e transiente fino all'epatite cronica. Circa il 40 % della popolazione mondiale è venuta in contatto con HBV e 370 milioni di persone sono portatori cronici dell'antigene di superficie del virus B (HBsAg). Ogni anno, circa un milione di persone muore per complicanze HBV-relate: cirrosi epatica, insufficienza epatica, epatocarcinoma (HCC)[1].

Il virus dell'epatite B umano è il prototipo dei membri della famiglia degli hepadnaviridae animali. Il genoma HBV è circolare, parzialmente a doppio filamento, è lungo circa 3.2kb e contiene 4 regioni sovrapposte: S, C, P e X. La regione dell'S contiene tre codoni di inizio che codificano per tre polipeptidi aventi un'estremità carbossiterminale comune: questa regione è la responsabile della comparsa dell'HBsAg, ovvero dell'antigene di superficie per il virus dell'epatite B. La regione P codifica per la polimerasi virale. La regione C contiene due codoni di inizio che codificano per l'antigene del core (HBcAg), responsabile della sintesi delle proteine del nucleocapside e per l'antigene solubile che, secreto nel flusso sanguigno, determina la comparsa dell'HBeAg. L'HBeAg è associato ad un'alta replicazione virale e ad uno stadio infettivo avanzato. Infine la regione dell'X codifica per una proteina che funge da attivatore della replicazione virale ed esplica altre funzioni regolatorie ancora non completamente delineate[2].

L'infezione cronica da virus B è una malattia progressivamente evolutiva che può risultare in complicanze quali la cirrosi epatica e l'epatocarcinoma (HCC). La fase cronica dell'infezione si instaura quando il virus permane in circolo per più di sei mesi e si caratterizza per la positività dell'HBsAg sierico. Al contrario, l'infezione dopo la fase acuta, viene controllata quando si verifica la scomparsa dell'HBsAg dal siero, la normalizzazione dei livelli di transaminasi e la comparsa di anticorpi per l'HBsAg

(HBsAb). Un profilo sierologico di HBsAg negatività, assieme alla positività degli anticorpi HBsAb e degli anticorpi anti-core (HBcAb), è indicativo pertanto della risoluzione dell'infezione. Tale evento si verifica in circa l'85-90% degli adulti immunocompetenti dopo la fase acuta, ma in una minima percentuale di casi, stimata attorno al 2%, può avvenire anche a seguito di un'infezione cronica di lungo corso[3;4].

1.2 Che cos'è l'Infezione Occulta da Virus B (OBI)

L'infezione Occulta da Virus B (OBI) costituisce ad oggi uno dei più interessanti argomenti in ambito di epatiti virali e la sua rilevanza clinica è nota da più di 30 anni.

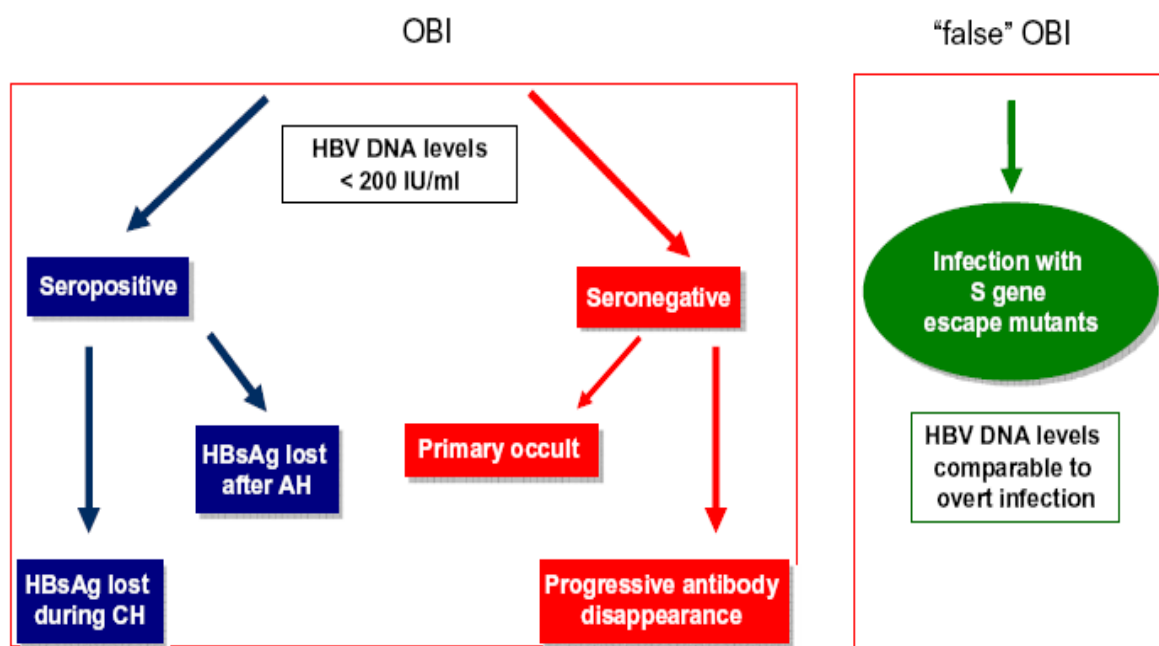
Tale interesse è principalmente dovuto al suo notevole impatto clinico, che risiede in: rischio di trasmissione in caso di trasfusione di sangue o di trapianto di fegato, rischio di riattivazione in condizioni di immunosoppressione, potenziale ruolo nella progressione dell'epatite cronica e nelle conseguenti strategie terapeutiche ed infine potenziale ruolo nello sviluppo di epatocarcinoma. Descritta per la prima volta nel 1970 questa particolare forma di infezione deve ancora essere chiaramente caratterizzata. In particolare, negli ultimi dieci anni, grazie all'avvento di nuove tecniche di biologia molecolare (RT-PCR, Nested-PCR), parte delle sue caratteristiche virologiche, nonché le sue implicazioni cliniche, sono state chiarite. Tuttavia numerosi aspetti restano ancora perlopiù da comprendere e tra questi ci sono una chiara definizione di questo tipo di infezione ed un approccio laboratoristico standardizzato per la sua diagnosi[5].

La possibilità di contrarre il virus dell'epatite B, in seguito a trasfusione di sangue proveniente da donatore esclusivamente HBcAb positivo, è stata valutata soltanto negli ultimi 30 anni. Tale possibilità ha messo in evidenza che pazienti HBsAg negativi nel siero, con marcatori che testimoniano un precedente contatto col virus, possono ancora contenere virus infettante. E' stato infatti dimostrato che l'HBV-DNA può essere rilevato nel siero e/o nel fegato dei pazienti anche molto tempo dopo la scomparsa dell'HBsAg, sia in caso di epatite acuta "self-limited", sia in seguito ad efficace trattamento farmacologico della forma cronica. Questa forma di infezione HBV è appunto definita HBV occulto (OBI).

L'infezione occulta da virus dell'epatite B si definisce pertanto per la presenza dell'HBV-DNA nel siero e/o negli epatociti di soggetti HBsAg negativi, con o senza

marcatori virali indicativi di una precedente infezione (HBcAb e HBsAb); esiste infatti una proporzione di pazienti, stimata attorno al 20%, sierologicamente negativa a tutti i marcatori virali. OBI è stata rilevata in pazienti affetti da HCC HBsAg negativi, in pazienti HCV e nei così detti gruppi a rischio: emodializzati, emofiliaci e coloro che abusano di sostanze stupefacenti per via endovenosa [3-5].

Il tratto comune degli individui affetti da HBV occulto (OBI) è l'HBsAg negatività, in presenza di livelli di HBV-DNA rilevabili nel fegato e livelli di HBV-DNA nel siero rilevabili o meno. Qualora rilevabili, i livelli di HBV-DNA sono comunque molto più bassi rispetto a quelli caratteristici di un'infezione HBV "manifesta", motivo per cui l'aumento della sensibilità delle tecniche di biologia molecolare (Nested-PCR e RT-PCR) è stato fondamentale per la ricerca in questo ambito. Relativamente agli altri marcatori sierologici invece, i soggetti OBI possono essere distinti in OBI sieropositivi (HBsAb e HBcAb positivi); OBI sieronegativi (HBsAb e HBcAb negativi) e "falsi OBI". Nei soggetti **OBI positivi** la negativizzazione dell'HBsAg può avvenire successivamente alla fase acuta dell'infezione e richiedere dei mesi, oppure può avvenire dopo anni di infezione cronica. I soggetti **OBI negativi** sembrano perdere progressivamente gli specifici anticorpi per il virus B o li mantengono soltanto nella fase iniziale dell'infezione. I "**falsi**" OBI presentano livelli di HBV-DNA analoghi a quelli rilevabili nelle differenti fasi dell'infezione "manifesta" ma i livelli di HBsAg prodotti non risultano detectabili con le metodiche attualmente in uso. Questo sembra essere dovuto alla produzione di proteine codificate da un gene S mutante [5].

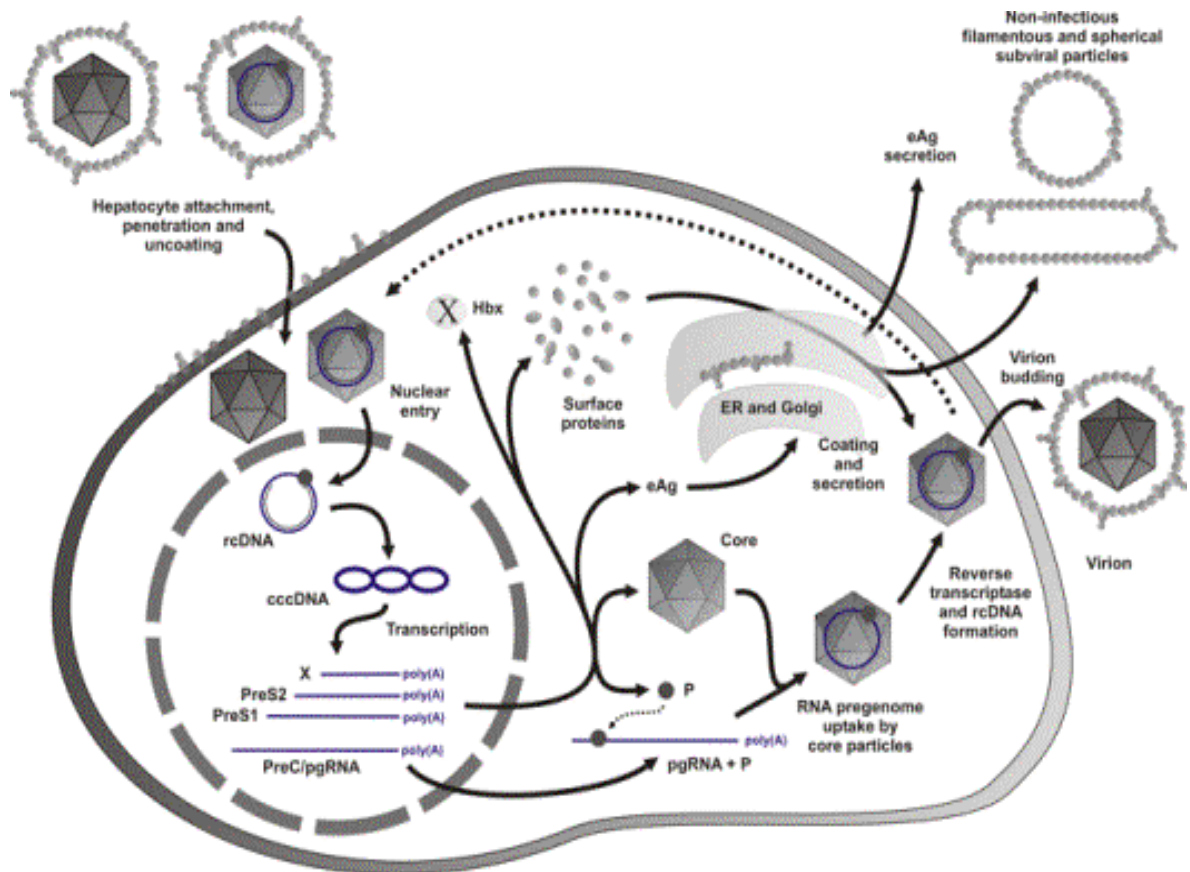


In caso di OBI sono infatti state rilevate una serie di mutazioni, è tuttavia ancora da chiarire se queste siano causa o conseguenza di questo tipo di infezione. Tra le mutazioni Tra le mutazioni più frequentemente riscontrate ci sono:

- a) **Delezione della regione Pre-S** mediatrice della sintesi di proteine recettoriali;
- b) **Splicing della regione PRE** (Post-Transcriptional-Regulatory-Element): lo splicing dell' m-RNA in questa regione crea proteine aberranti dalla funzionalità sconosciuta; inoltre l'alterazione della regione PRE può determinare difficoltà nel trasferimento dei virioni dal nucleo al citoplasma (per splicing si intende quel processo che insieme al capping e alla poliadenilazione permette il passaggio da m-RNA trascritto primario ad m-RNA maturo, ovvero che permette la maturazione del trascritto primario dei geni discontinui);
- c) **Delezione della regione esone introne 458-459**: la delezione di questa porzione può dare problemi di accumulo di Pre-S2/S m-RNA;
- d) **Splicing della regione 2986-202** (scoperta più recente): pare che possa interferire e abolire la funzionalità dell'S senza alterare la funzionalità di P, C e X. In virtù di questo splicing il genoma virale potrebbe rimanere incapsidato nella cellula ospite, perdendo la propria capacità di sviluppo e di inserimento in altre cellule. Tale splicing sarebbe quindi in grado di generare particelle virali deficienti, la cui prospettiva di vita è funzione di quella della cellula ospite. Tuttavia la selezione randomizzata delle mutazioni, insieme alla selezione naturale durante la vita dell'individuo, possono permettere al virus di riacquisire la normale funzionalità. Le cellule che producono virioni che sfuggono al controllo del sistema immunitario per anomalia dell'S possono causare riattivazione in condizioni di immunosoppressione [6].

Le basi molecolari dell'infezione HBV occulta sono strettamente legate al caratteristico ciclo cellulare dell'HBV e in particolare allo step in cui si verifica la conversione di circa 3Kb di genoma virale circolare, in una struttura a DNA double-strand covalentemente legata (ccc-DNA). Il cccDNA è un intermedio replicativo stabile, che persiste nei nuclei

cellulari degli epatociti e funge da template per la replicazione virale. La stabilità e la persistenza a lungo termine delle molecole di cccDNA, insieme alla lunga emivita degli epatociti fa sì che l'infezione virale, una volta avvenuta, possa persistere anche per tutta la vita [5;7].



Quasi tutti i soggetti affetti da OBI sono infettati da un virus replicativo (competente nelle replicazione) che mostra però una forte soppressione dell'attività replicativa e dell'espressione genica, il che si risolve in una riduzione complessiva dell'attività virale. Alcuni OBI sono invece portatori di un virus B mutante, difettivo nella replicazione o nella sintesi della proteina S: ciò sembra essere dovuto rispettivamente a mutazioni nella regione della polimerasi e nella regione promotrice dell'S. Il fatto che, come in caso di infezione da HBV “manifesta” l'HBV-DNA conservi la capacità di integrarsi nel genoma dell'ospite, conferma il mantenimento del potere oncogenico del virus B anche in questo tipo di infezione e conseguentemente il suo potenziale ruolo nello sviluppo di epatocarcinoma [5;7]. Sotto il punto di vista immunologico, è noto da diverso tempo come gli OBI sieropositivi mostrino una risposta T-cellulare virus specifica a lungo termine nei confronti degli epitopi HBV, che determinano il controllo delle minime

quantità di virus circolanti. Uno studio recente ha inoltre chiarito come siano identificabili diversi profili immunitari a seconda della positività dell'anticorpo anticore: gli individui OBI anti-HBc mostrano infatti una risposta suggestiva di protezione, mentre gli OBI-HBc-negativi pur presentando risposte ex vivo, sembrano aver perduto la capacità di espandersi e di produrre citochine, suggerendo che probabilmente questa forma di infezione è indotta da minime quantità antigeniche iniziali, non sufficienti a sviluppare una reazione immunitaria potente e protettiva [8].

In definitiva, nell'infezione occulta si realizza una forte inibizione della replica e dell'espressione genica virale, che è responsabile non solo dell'HBsAg negatività ma anche del minimo, se non nullo livello di HBV-DNA sierico, caratteristico della maggioranza dei pazienti affetti da HBV occulto. I meccanismi di tale effetto soppressivo rimangono ad oggi ancora da chiarire, e basati solo su evidenze indirette [1;4;6].

Tra quelli proposti ci sono la risposta immune dell'ospite, la presenza di co-infezioni e di fattori epigenetici. La co-infezione con altri agenti infettanti, virali e non, è stata chiamata in causa come fattore addizionale in grado di inibire la replicazione di HBV e l'espressione genica; a conferma di questo concetto, la più elevata prevalenza di infezione occulta è stata rilevata in pazienti con infezione cronica da HCV e studi in vitro hanno dimostrato come la proteina del core di HCV agisca da potente inibitore della replicazione HBV. Infine, anche agenti infettanti non virali possono agire da potenziali soppressori dell'attività virale.

E' stato suggerito che anche fattori epigenetici possano giocare un ruolo chiave nell'induzione dello status occulto: è stato infatti evidenziato come le molecole di HBV-cccDNA organizzate come microsomi virali, siano soggette ad attività enzimatiche anomale, dovute a modifiche dell'ambiente intraepatico, a loro volta determinate dalla presenza di coinfezioni, di agenti chimici o citochine [3;5;9].

L'infezione da HBV occulto è diffusa a livello mondiale e la sua distribuzione riflette la generale prevalenza dell'HBV nelle varie aree geografiche; è ormai concordemente accettato che i pazienti infetti da HCV costituiscano la categoria di individui con maggior prevalenza di infezione occulta (circa un terzo dei soggetti HCV positivi nel bacino del Mediterraneo, proporzione che diventa ancora più elevata nelle aree dell'Est Asiatico). In generale, oltre a pazienti con epatopatia, tutte le categorie di pazienti a rischio di

infezioni a trasmissione parenterale (tossicodipendenti, emodializzati, HIV-positivi) sono state ampiamente valutate per la presenza di infezione occulta, sebbene con il raggiungimento di risultati talora divergenti.

1.2.1 OBI e Riattivazione

Come precedentemente detto in caso di OBI si verifica una forte soppressione dell'espressione genica e dell'attività replicativa virale, nella quale la risposta immunitaria dell'ospite gioca il ruolo principale. Tale stato soppressivo può tuttavia essere discontinuo e condurre ad una tipica epatite B con decorso estremamente severo e in alcuni casi anche fulminante. Questo evento si verifica più frequentemente in pazienti in condizioni di immunosoppressione indotta dalla terapia e/o legata a patologie del sistema immunitario [11;12]. Un soggetto OBI positivo che diventi immunocompromesso, può mostrare una riattivazione immuno-mediata dell'attività replicativa virale e danni CTL-mediati agli epatociti, ciò conduce inevitabilmente allo sviluppo di epatite. La riattivazione clinica e virologica di OBI è stata ripetutamente osservata in pazienti emato-oncologici, in soggetti HIV-positivi, in caso di trapianto di cellule staminali ematopoietiche e nel trapianto d'organo. Inoltre nuovi potenti farmaci immunosoppressivi come gli anticorpi monoclonali anti-CD20, antiCD-25 e anti-TNF, recentemente introdotti nella pratica clinica, sembrano poter causare un ulteriore aumento del rischio di riattivazione di HBV [7]. Lo stato di soppressione tipico della replica virale viene quindi rapidamente alterato quando lo stato di equilibrio sistema immune/ospite venga perturbato da condizioni patologiche o farmacologiche che inducono immunosoppressione (infezione da HIV, trapianto di organo solido o di midollo). La riattivazione avviene frequentemente anche nei soggetti HIV soprattutto dopo sospensione della terapia con antagonisti antiretrovirali.

1.2.2 OBI e Trasfusione

In campo trasfusionale gli anticorpi anti-HBc sono stati inizialmente utilizzati come markers indicativi di una epatite non-A e non-B. Con l'aumento delle metodiche disponibili per lo screening anti-HCV l'analisi della presenza di anti-HBc è divenuta invece un potenziale mezzo per la prevenzione della trasmissione di OBI. Nelle aree a bassa incidenza come il Nord Europa e il Nord America la maggior parte degli individui

anti-HBc positivi sono anche anti-HBs positivi. Soggetti con alti livelli di anti-HBs sono in genere HBV-DNA negativi, mentre con bassi livelli di anti-HBs si può avere HBV-DNA circolante. Soggetti esclusivamente anti-HBc positivi vengono definiti “anti-HBc only” pur presentando anche, in genere, un alto titolo di anticorpi anti-HBe. Ci sono due possibili spiegazioni alla sieropositività esclusiva per l’anti-HBc:

1. dopo anni di infezione HBV cronica non produttiva i livelli di HBsAg circolanti diventano talmente bassi da non essere più rilevabili;
2. la relativamente breve persistenza dell’anti-HBs che fa sì che l’anti-HBc sia l’unico marker di infezione HBV rilevabile.

Come nelle altre infezioni di natura virale, anche in caso di HBV si può affermare che l’infettività dipende da due fattori: la dose di virus infettante e l’immunocompetenza dell’ospite. Considerando il volume di materiale potenzialmente infettivo utilizzato in caso di trasfusione, donazione di sangue o di suoi componenti, è generalmente accettato che qualora vi sia dell’HBV-DNA l’infezione si può verificare. Già da tempo è stato chiarito come vi sia una relazione inversamente proporzionale tra i livelli di anti-HBs e il grado di infettività: il 10 % di unità di sangue con bassi livelli di anti-HBs possono essere infettive. L’infettività da donatore anti-HBs positivo in pazienti immunodeficienti o immunocompromessi deve ancora essere indagata [13].

Al contrario il potenziale infettivo che si può avere da donatore esclusivamente anti-HBc positivo è noto da anni [14;15]. I dati finora ottenuti, pur essendo basati esclusivamente su saggi sierologici, mostrano che non più del 4 % degli individui ricevuti sangue da donatore esclusivamente anti-HBc positivo sviluppano un’infezione HBV post-trasfusionale. La discrepanza tra l’alta carica virale e la relativamente bassa frequenza di infezioni post trasfusionali, suggerisce che non solo le cellule con HBV-DNA siano infettanti. Quindi, sebbene non assoluti, tutti i dati finora raccolti suggeriscono che, quando l’HBV-DNA non è rilevabile (presumibilmente perché ad una concentrazione troppo bassa) i portatori del solo anti-HBc hanno un potenziale infettivo molto alto nei soggetti immunodeficienti [16;17].

Uno dei principali problemi posti dall’infezione occulta da HBV risiede quindi nella possibilità di costituire fonte di trasmissione virale in caso di trasfusione. Attualmente, dal momento che la trasmissione di HBV post-trasfusionale è un’evenienza molto rara,

l'infezione da HBV occulta dei donatori rappresenta il principale fattore responsabile dei casi residui. L'infezione occulta può anche essere trasmessa in corso di trapianto d'organo, soprattutto in caso di trapianto di fegato, come ovvia conseguenza del fatto che gli epatociti fungono da serbatoio di virus. Il rischio principale di trasmissione di HBV occulto in caso di trapianto si ha con il trapianto di fegato ortotopico da donatore sieronegativo, in particolare se il donatore è negativo per tutti i marcatori sierologici. Al contrario, la trasmissione di HBV occulta in trapianto di rene, cuore o midollo osseo, è un'evenienza piuttosto rara[5].

1.2.3. OBI e HCC

A livello mondiale l'infezione da HBV è il maggior fattore di rischio per lo sviluppo di epatocarcinoma (HCC). Negli ultimi trent'anni la ricerca ha focalizzato molto la propria attenzione sul ruolo che HBV riveste nell'epatocarcinogenesi: due sembrano essere i principali meccanismi HBV-relati che contribuiscono allo sviluppo di HCC.

1. l'integrazione del genoma virale in quello dell'ospite risulta nella perdita della funzionalità dei geni tumore soppressori e/o nell'attivazione di geni tumore promotori;
2. l'espressione di fattori trans-attivati derivanti dal genoma HBV i quali potrebbero influenzare la trasduzione del segnale intracellulare e alterare l'espressione genica dell'ospite.

L'integrazione del genoma virale in quello dell'ospite è stata rilevata nell'85-90% degli epatociti di soggetti con HCC/HBV-relato, tuttavia non è ancora stato possibile individuare quali geni umani siano i preferenziali target dell'inserzione di HBV. Alcuni geni HBV sono stati rilevati nel tessuto tumorale più frequentemente di altri: gene troncato preS2/S, gene X ed uno splicing del genoma HBV recentemente identificato. Le proteine espresse da questi geni integrati sembrano avere attività intracellulare, la quale potrebbe essere responsabile dello sviluppo di HCC mediante effetti di crescita cellulare e apoptosi. I geni che sembrano essere principalmente alterati, nella loro funzionalità, dall'inserzione di HBV sono: quelli regolanti l'immortalità cellulare (hTERT), la proliferazione (MAPK1, ciclina A) e la mobilità (recettore TNF-proteina 1 associato). Nella trans attivazione virale, sembra che il ruolo principale sia svolto dalla proteina X

(HBx) che gioca un ruolo pleiotropico ed è stata implicata nella trasformazione maligna di cellule epatiche cronicamente infette. La proteina X sembra infatti interferire con la proliferazione, l'apoptosi (p53, TNF, Fas, TGF-beta), la senescenza cellulare e i meccanismi di riparazione del DNA (UVDDDB1). Recentemente è stato notato come alti livelli sierici di HBV-DNA possano essere predittivi di un aumento di rischio di sviluppo di HCC, indipendentemente dai livelli sierici di HBeAg e di ALT. Inoltre è stato notato che il genotipo C di HBV, rispetto agli altri, è associabile ad un più alto rischio di sviluppo di HCC. Tutto ciò suggerisce che la carica virale e la determinazione del genotipo sono importanti fattori da considerare per lo screening della rilevazione di HCC e le indicazioni al trattamento

Alcuni pazienti HCC non presentano HBsAg sierico ma comunque hanno bassi livelli sierici di HBV-DNA e frammenti di HBV-DNA integrati nel genoma cellulare dell'ospite: possono quindi definirsi occulti. Un alto grado di OBI è stato registrato in pazienti affetti da HCC, in particolare nei soggetti HCV positivi, suggerendo che OBI può aggravare il decorso dell'infezione da HCV [18]. In questi pazienti l'HBV-DNA è stato rilevato nel tessuto tumorale e/o nel tessuto epatico non tumorale adiacente mediante PCR, sia nei soggetti anti-HCV positivi che negli anti-HCV negativi. Alcuni di questi soggetti presentano anti-HBc come unico marcatore di precedente contatto con il virus B. Il ccc-DNA è stato rilevato nel fegato di alcuni di questi pazienti confermando la persistenza del ccc-DNA come template per la trascrizione e la replicazione virale [19;20]. Le alterazioni dell'attività cellulare legate all'inserzione di HBV nel genoma dell'ospite sono state rilevate anche in caso di infezione occulta. In conclusione, sebbene sia ormai evidente il ruolo oncogeno di HBV sia in caso di infezione manifesta che in caso di OBI, alcuni aspetti devono ancora essere chiariti:

1. se esista una correlazione tra la carica virale e il rischio di sviluppo di HCC in tutti i soggetti HBV-positivi, indipendentemente dai valori sierici di HBeAg, dai livelli di ALT e dallo stadio di progressione dell'epatite;
2. se una singola valutazione nel decorso clinico possa predire la prognosi del portatore di HBV;
3. se la terapia antivirale possa essere utile alla riduzione del rischio di sviluppo di HCC [2].

1.2.4. OBI e Progressione della Malattia Epatica

Il danno epatico causato dall'HBV è senza dubbio immuno-mediato e principalmente dovuto all'attività delle cellule T HBV-specifiche. È inoltre da notare l'importante ruolo che chemochine aspecifiche, neutrofili e cellule Natural Killer (NK) svolgono nell'insorgenza del danno epatico HBV-relato. Il rilascio di citochine infiammatorie e di chemochine e la persistenza del rilascio di fattori mediatori dell'infiammazione può determinare l'insorgenza di cirrosi, caratterizzata dalla presenza di noduli rigenerativi, di una irreversibile fibrosi e l'aggravamento del danno epatico; inoltre la cirrosi è di per sé uno stato predisponente allo sviluppo di HCC [2]. Studi condotti in aree geografiche differenti hanno mostrato un'associazione tra OBI e la manifestazione di un severo danno epatico, soprattutto in pazienti affetti da HCV, ciò suggerisce che OBI possa favorire o accelerare, in questi individui, la progressione verso la cirrosi [21]. In caso di OBI, l'attività replicativa virale, soppressa, ma persistente, mantiene la propria attività patogena di fatto, come nei casi di epatite manifesta, anche diversi anni dopo la risoluzione della fase acuta dell'infezione, può essere osservato un leggero stato di necro-infiammatorio, rilevato per altro sia nel modello animale che nell'uomo[7]. Sebbene sia accettato che l'infezione occulta in pazienti immunocompetenti sia di per sé innocua, in presenza di altre cause di danno epatico, la seppur minima attività del sistema immunitario può contribuire a rendere il decorso dell'epatopatia più rapido e severo [5]. Inoltre diversi studi indicano come OBI possa essere associata alla progressione della fibrosi anche in pazienti affetti da epatopatia ad eziologia criptogenetica [22]. Tale osservazione non è facile da spiegare, anche in considerazione di quanto prima affermato, ovvero che da solo, OBI, non è in grado di produrre un danno epatico severo. Probabilmente in alcuni dei soggetti con infezione HBV produttiva si verifica una progressiva riduzione della replicazione virale e dei livelli sierici di HBsAg. In effetti la progressiva scomparsa dell'HBsAg dal siero si può verificare anche in presenza di un severo danno epatico provocato, prima da un'infezione HBV manifesta e poi mantenuto dall'insorgenza dello status occulto [7]. Considerando infine che la cirrosi è la principale lesione precancerosa del fegato, il possibile ruolo giocato da OBI nella progressione della fibrosi può essere un fattore implicato nella progressione della carcinogenesi; oltre al già

citato meccanismo carcinogenetico diretto, dovuto all'inserzione dell'HBV-DNA nel genoma dell'ospite [23].

1.2.5. OBI e HCV

HBV e HCV condividono fattori di rischio e vie di trasmissione, conseguentemente la coinfezione HBV/HCV è frequente nelle aree ad alta endemia per HBV e tra le persone ad alto rischio di trasmissione parenterale. Pazienti con malattia epatica cronica (CLD) frequentemente mostrano i markers di un precedente contatto con il virus B e possono anche essere portatori di un'infezione occulta da virus B [24]. La coinfezione HBV/HCV può avere effetti sia sui parametri biochimici e clinici che sulla gravità della malattia epatica. La valutazione dell'esistenza di una coinfezione HBV/HCV viene effettuata valutando la presenza dell'HBsAg sierico; tale screening è di importanza fondamentale in quanto se l'infezione HBV è presente deve essere curata, se assente può essere prevenuta con la vaccinazione e in ogni caso è opportuno valutarne la presenza in quanto può aggravare la malattia epatica ed influenzare la risposta alla terapia. La presenza di anticorpi anti-HBc con la concomitante perdita degli anti-HBs può essere dovuta a: risoluzione dell'infezione HBV, presenza dello status occulto o ad risultato falso-positivo. Un recente studio ha riportato che il 50% di pazienti affetti da HCV, HBsAg e anti-HBs negativi, mostrano positività per gli anticorpi anti-HBc [25]; questo notevole tasso di incidenza è stato riportato anche in un precedente studio su pazienti HCV con o senza coinfezione HIV[26]. Ciò riflette la similarità delle vie di trasmissione e dell'endemia delle due infezioni (HCV/HIV) dove la rilevazione dell'HBV-DNA, mediante PCR, conferma la presenza dell'infezione occulta ed esclude che si tratti di falsi positivi. La frequenza dell'infezione occulta tra i soggetti anti-HBc positivi è ancora argomento di indagine, uno studio ha mostrato un'incidenza del 30% di OBI tra soggetti HCV positivi con particolare frequenza tra gli anti-HBc positivi[27]. La più alta prevalenza di positività agli anticorpi anti-HBc tra i soggetti HCV piuttosto che tra i soggetti cirrotici può essere spiegata alla luce dell'effetto inibitorio che pare i due virus esercitino l'uno sull'altro. In conclusione un profilo sierologico indicativo di un precedente contatto con il virus B è frequente nei pazienti HCV cronici e in alcuni di questi è indicativo della presenza di un'infezione occulta. Il solo screening dell'HBsAg e

dell'anti-HBs tra i pazienti HCV non è quindi più sufficiente, in quanto non è in grado di individuare i soggetti esclusivamente anti-HBc positivi, nonché gli OBI, quindi la valutazione dell'anti-HBc è fondamentale per escludere sia la presenza di coinfezione che di infezione occulta [25].

1.3 NASH e NAFLD

Il termine NASH (Non Alcoholic Steatohepatitis), coniato da Ludwig [28] nel 1980, descrive un esito di biopsia epatica caratterizzata da steatoepatite in assenza di un significativo consumo di alcool. La NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) è invece correntemente definita come un accumulo di grasso nel fegato, in eccesso del 5%-10% di peso e praticamente valutata come percentuale di epatociti grassi osservabili al microscopio ottico. Il panorama di alterazioni istologiche caratteristiche della NAFLD va dalla steatosi semplice (steatosi in assenza di altri danni epatici), alla NASH, che è la forma più grave di NAFLD. L'accumulo di grasso caratteristico della NASH ha diversi stadi di gravità: formazione di micro e macro vescicole, infiammazione lobulare e fibrosi (in zona 3 e portale). Recentemente si è cercato di classificare i diversi stadi della NAFLD in maniera tale da poter correlare alcuni parametri istologici con una prognosi a lungo termine [29].

1. **classe 1:** steatosi semplice;
2. **classe 2:** steatosi con infiammazione lobulare;
3. **classe 3:** steatosi con presenza di epatociti balloniformi;
4. **classe 4:** steatosi con presenza di corpi di Mallory e fibrosi;

In base a questa classificazione, le classi 3 e 4 di NAFLD possono essere considerate simili e quindi raggruppate in un'unica, costituente la categoria della NASH. La classe 2 è la più controversa da caratterizzare in quanto vi possono rientrare sia soggetti con un BMI (Body Mass Index) alterato, che soggetti con un BMI normale. Le classi 3 e 4 di NAFLD, ovvero la NASH, si caratterizzano anche per uno stadio 4 di fibrosi. E' inoltre stato suggerito che, la classe 4 di NAFLD ovvero la forma più severa di NASH, possa coincidere con: NASH con cirrosi, cirrosi con le caratteristiche della steatoepatite e cirrosi criptogenetica. E' ormai accettato che la cirrosi criptogenetica rappresenti l'ultima fase della NASH, con perdita delle tipiche caratteristiche di necroinfiammazione e di

steatosi in più dell'80% dei pazienti. La NAFLD è forse la più comune tra tutte le malattie epatiche: è stata rilevata nel 70% dei soggetti obesi e nel 35% dei magri; la NASH, rispettivamente nel 18.5% e 2.7%[30]. La biopsia epatica è ad oggi l'unico mezzo per affermare con certezza la presenza e l'estensione del danno necroinfiammatorio e della fibrosi; tuttavia alcuni parametri clinici possono essere predittivi allo sviluppo di NASH: età compresa tra 40-50 anni, grado di obesità, iperlipidemia (in particolare ipertrigliceridemia), alti livelli di AST e ALT e resistenza insulinica (IR). Negli ultimi cinque dieci anni la sopravvivenza alla NASH è stata stimata stabilirsi rispettivamente attorno al 60%, tuttavia in caso di fattori di comorbidità l'esito può spesso essere fatale [31;32].

L'accumulo di lipidi nel fegato, è quindi una condizione rilevata frequentemente nei soggetti sani, non affetti da altri disordini epatici e non alcolisti. In presenza di steatosi, solo una piccola percentuale di pazienti sviluppa un danno epatico severo, quando come detto, la NAFLD si presenta nella sua forma più grave, cioè la NASH; evento che si verifica in circa il 2% dei casi. Mentre prima la steatosi era considerata "benigna" e semplicemente ignorata, oggi è riconosciuta come "co-fattore" capace di influire sulla gravità, la progressione e le prospettive terapeutiche della malattia epatica.

1.3.1 NASH e HCV

La steatosi epatica è presente in circa il 50% dei soggetti affetti da HCV; questa prevalenza, certamente più alta rispetto a quella rilevata nella popolazione generale, suggerisce un possibile effetto diretto del virus C sul suo sviluppo. Tale ipotesi è supportata da diversi studi che hanno correlato la steatosi sia a caratteristiche dell'ospite (BMI, Waist Circumference [WC], IR), che a fattori virale (carica virale e genotipo) [33].

1.3.2 NASH e Fattori dell'Ospite

Tra i fattori di rischio per lo sviluppo di epatiti croniche (CHC) e di NAFLD si annoverano: un alto BMI, diabete mellito di tipo 2, età avanzata, consumo di alcol e gravità dello stadio di steatosi. La maggiore incidenza di steatosi in pazienti HCV positivi, rispetto ai CHC, è statisticamente confermata indipendentemente dal genotipo HCV.

1.3.3 NASH e Fisiopatologia

I meccanismi fisiopatologici che sottendono lo sviluppo della steatosi sono ancora oggetto d'indagine; tutte le ipotesi finora fatte, sono confermate da studi in vitro e sul modello animale. Tra i meccanismi coinvolti: stress ossidativo, attivazione delle cellule stellate, alto grado di apoptosi, che è conseguenza diretta dello stress ossidativo e alterazione dei meccanismi di risposta al danno cellulare. La fibrosi sembra invece essere riconducibile ad alcune sindromi metaboliche (MS) quali l'iperinsulinemia e l'iperglicemia. La presenza di un fegato grasso sembra essere principalmente legata al danno indotto da quei fattori che determinano un aumento di sostanze ossidanti a livello epatico; in particolare la risposta immunitaria nei confronti dell'infezione HCV. Tale evento è in grado di determinare un incremento dello stress ossidativo, intensificando la lipoperossidazione e la produzione di citochine infiammatorie con conseguente aumento del processo apoptotico [33]. Nei pazienti HCV è stato notato che la riduzione del peso corporeo, ottenuta con la dieta o con interventi bariatrici, riduce significativamente sia la steatosi che la fibrosi [34].

1.3.4 NASH e HBV

Data quindi per assodata la relazione tra steatosi epatica e HCV, è stato ipotizzato che analogamente si potessero comportare steatosi e HBV. Solo un ristretto numero studi riguardanti l'argomento sono stati pubblicati; alcuni riportano una prevalenza di steatosi nei soggetti HBV [35;36]; altri considerano BMI, obesità e steatosi sovrapponibili nel confronto CHC vs HBV. In questi ultimi la prevalenza della steatosi nei soggetti HBV risulta simile a quella riscontrabile nella popolazione generale; emerge infatti che la steatosi correla con BMI, MS, ipertensione e dislipidemia, ma non con carica e genotipo virali, tantomeno con la fibrosi. In base a questi dati si potrebbe quindi affermare che la correlazione steatosi/HCV è specifica mentre quella steatosi/HBV non lo è. D'altra parte, nelle epatiti croniche HBV-relate, la steatosi è comunque un cofattore in grado di aggravare il danno epatico, in particolare se il soggetto si caratterizza per alti BMI e MS : ciò si traduce spesso in una reale condizione clinica di steatoepatite [37].

Possiamo quindi concludere che la steatosi epatica può essere considerata una patologia "benigna" nei soggetti sani, ma diventa un pericoloso cofattore di progressione della

malattia epatica quando si presenta in soggetti portatori di altre cause di danno epatico. La steatosi può quindi avere effetti sulla risposta al trattamento antivirale nei pazienti HCV e può essere un cofattore responsabile dello sviluppo di HCC sia in pazienti HCV che negli alcolisti. Sempre di più, ad oggi, la steatoepatite viene considerata un importante cofattore di progressione del danno epatico che deve essere presa in esame per la diagnosi e la conseguente scelta dell'intervento terapeutico [38].

1.4 *Epatopatie ad Eziologia Criptogenetica*

Per epatopatie ad eziologia criptogenetica si intendono tutte le forme epatopatiche non riconducibili alle classiche cause determinanti epatopatia: infezione da HBV, da HCV, da HAV e alcolismo; in definitiva tutte quelle epatopatie l'origine delle quali è fondamentalmente sconosciuta. Come si può evincere dalla stessa definizione le epatopatie criptogenetiche sono ad oggi ancora per lo più sconosciute, la maggioranza degli aspetti che le riguardano, da una chiara definizione, all'individuazione dei meccanismi e delle cause che le determinano, sono da chiarire e sono quindi tuttora oggetto di studio. Le cirrosi criptogenetiche (CC), ovvero a sconosciuta eziologia, possono essere anch'esse annoverate tra le epatopatie ad eziologia criptogenetica. La terminologia e le condizioni caratteristiche di questo tipo di malattia epatica sono controverse e spesso oggetto di modifiche sia da parte dei patologi che dei clinici. In genere i pazienti affetti da CC hanno età media e solo lievi alterazioni degli enzimi e della funzionalità epatica [41]. Diverse evidenze indicano che la NAFLD sia una delle principali cause di CC; nella letteratura Europea è inoltre stata notata un'associazione tra CC e presenza di epatite autoimmune (AIH) sfuggita magari ad una prima diagnosi [39]. Diversi studi epidemiologici indicano che anche la NASH sia una causa di cirrosi criptogenetica: in questo senso la presenza di NASH potrebbe spiegare l'insorgenza di cirrosi là dove quest'ultima non sia riconducibile ad un'infezione HCV [40]. Il ruolo dell'infezione da HBV nell'insorgenza di epatopatia criptogenetica, indagato nelle aree a media ed alta endemia per l'epatite B è controverso. In particolare uno studio Iraniano si è occupato della valutazione della prevalenza dell'epatopatia criptogenetica in soggetti HBsAg negativi, dove l'HBsAg negatività veniva ricondotta o a mutazioni a carico dell'S o ad una bassa carica virale; è stato quindi valutato il ruolo che l'infezione occulta

potrebbe rivestire nell'insorgenza dell'epatopatia criptogenetica. A causa dell'esiguità del gruppo di controllo disponibile in questo studio, i risultati ottenuti non sono di attendibilità inequivocabile; tuttavia non permettono neanche di escludere completamente un potenziale ruolo di OBI nell'epidemiologia dell'epatopatia criptogenetica. Quanto affermato in questo studio è inoltre in contraddizione con i risultati provenienti da aree a diversa endemia per HBV, come conseguenza del fatto che ad aree geografiche diverse, corrispondono anche genotipi virali diversi [42]. Concludendo, riguardo le epatopatie ad eziologia criptogenetica molto rimane ancora da chiarire, poiché l'unico elemento certo di cui disponiamo a riguardo, è l'incertezza della loro origine.

2. OBIETTIVO

Le continue ricerche nell'ambito dell'infezione occulta da virus B indicano come la presenza di OBI possa accelerare la progressione della malattia epatica fino alla cirrosi e all'epatocarcinoma, patologie verso le quali frequentemente evolve chi è affetto da HCV, steatoepatite ed epatopatia criptogenetica; ed in più sottolineano come l'individuazione di OBI possa avvenire solo tramite metodiche di laboratorio molto sensibili e sofisticate. A complicare l'aspetto diagnostico, interviene anche la necessità di dover ricorrere ad un esame invasivo e non esente da rischi, quale la biopsia epatica. Nonostante le ricerche in questo ambito siano progredite, i risultati degli studi finora effettuati sono ancora preliminari, dal momento che resta da stabilire sia l'entità del fenomeno, sia le conseguenze che essa può comportare. Mentre la coorte di pazienti con infezione cronica da virus C dell'epatite è stata meglio studiata, essenzialmente dal momento che il virus C e B dell'epatite condividono le stesse modalità di infezione, non si dispone di molte informazioni sulla prevalenza del fenomeno in altre tipologie di pazienti epatopatici. In particolare, ad oggi non ci sono evidenze conclusive né sui correlati virologici dell'infezione, né quelli su immunologici. Questo ultimo aspetto è particolarmente importante, dal momento che il profilo immunologico costituisce il parametro principale capace di condizionare l'outcome di pazienti con infezione da HBV, e determinarne l'evoluzione verso una forma acuta autolimitantesi o verso la cronicizzazione [43]. Mentre i pazienti con infezione controllata (anti-HBs e anti-core positivi), si ritiene presentino generalmente risposte vigorose e perduranti negli anni, nello specifico le caratteristiche e la cinetica della risposta immune non si conoscono. Analogamente, eccettuato uno studio preliminare [8], non si dispone di informazioni sul profilo immunitario anti-HBV in pazienti affetti da infezione occulta. L'acquisizione di informazioni in questo ambito potrebbe anche avere un impatto applicativo, dal momento che potrebbe portare all'allestimento di un test diagnostico sul comparto periferico, dunque molto più accessibile rispetto all'analisi tissutale, ed effettuabile su più larga scala.

Sulla base di queste premesse ci siamo proposti di individuare la presenza e la prevalenza dell'Infezione Occulta da Virus B in diversi gruppi di pazienti, affetti da diverse forme di malattia epatica:

1. ad Eziologia Virale: Infezione Cronica da virus dell'epatite C (HCV) o da virus dell'epatite B (HBV, soggetti utilizzati come gruppo di controllo)
2. ad Eziologia Non Virale: Steatopatie non Alcolica (NASH) ed Epatopatia ad Eziologia Criptogenetica (CRIPTO).

L'obiettivo primario è consistito nell'analisi della presenza e della prevalenza di OBI nei due gruppi di pazienti epatopatici sopra indicati a partire da materiale bioptico e da prelievo di sangue periferico. In secondo luogo, è stata effettuata l'analisi di sequenza sui campioni OBI positivi al fine di individuare mutazioni a carico dell'S o di altre regioni HBV, responsabili dell'HBsAg negatività e conseguentemente della sintesi di una proteina S mutata e perciò non rilevabile mediante le metodiche ad oggi in uso. Infine, sui campioni disponibili, obiettivo dello studio è stato la valutazione dell'eventuale presenza, tipologia ed entità della risposta immune nei pazienti OBI a differenti caratteristiche sierologiche: OBI sieropositivi (HBsAb, HBcAb positivi), OBI sieronegativi (HBsAb, HBcAb negativi).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione in Studio

L'analisi è stata condotta sui seguenti gruppi di soggetti:

- 42 soggetti affetti da Epatite Cronica da Virus C (HCV), (26 maschi, 16 femmine, età media 56 anni);
- 25 pazienti affetti da Steatoepatite non Alcolica (NASH), (18 maschi, 7 femmine, età media 46 anni);
- 7 pazienti affetti da Epatopatia ad Eziologia Criptogenetica (CRIPTO), (5 maschi, 2 femmine, età media 39 anni);
- 10 pazienti affetti da Epatite Cronica da Virus B (HBV), (7 maschi, 3 femmine, età media 48 anni).

Tutti i pazienti arruolati sono seguiti presso le strutture assistenziali del Dipartimento di Medicina Clinica, Unità Operativa di Semeiotica Medica, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, e le definizioni diagnostiche sono state attribuite secondo le linee guida nazionali ed internazionali in uso.

In particolare, il genotipo HCV infettante nel nostro gruppo di pazienti era così distribuito: 27/42 (64%) erano infetti dal genotipo 1; 14/42 (33%) dal genotipo 2 e 1/42 (3%) dal genotipo 4; esclusi 2 pazienti, dei 42 affetti da HCV, per i quali al momento della biopsia epatica la viremia era qualitativamente positiva ma quantitativamente non determinabile, per gli altri il valore della viremia mediana era 1.026.000 UI/mL (IQR= 247.750-4.652.000 UI/mL). Nessuno dei 42 soggetti HCV era in terapia al momento della biopsia epatica: a seguito della biopsia 35/42 (83%) dei soggetti sono stati sottoposti a terapia antivirale.

I pazienti con infezione cronica HBV erano definiti dal seguente pattern sierovirologico: HBsAg positivi, HBsAb negativi, HBcAb positivi, 2/10 HBeAg positivi e conseguentemente 8/10 HBeAg negativi; solo 1/10 HBeAb negativo, tutti gli altri HBeAb positivi.

A tutti i pazienti è stato prelevato un campione di sangue con anticoagulante, ed è stata trattenuta, a seguito della biopsia epatica percutanea, la parte di tessuto eccedente rispetto alla quantità necessaria all'iter diagnostico-terapeutico.

3.2 Valutazione Virologica

3.2.1 Estrazione di acidi nucleici totali da siero o plasma EDTA

L'estrazione è stata condotta utilizzando un Kit commerciale (*QIAGEN*, Milano, Italia), in accordo alle procedure operative previste. In dettaglio, la metodica ha previsto i seguenti passaggi:

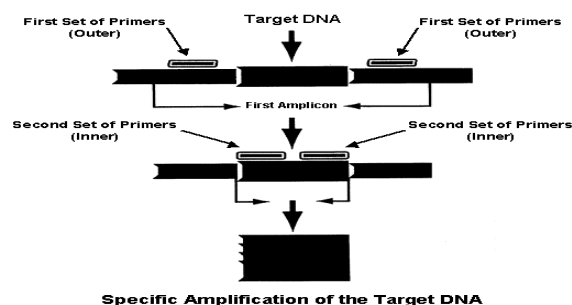
- 200 µl di siero o di plasma EDTA sono stati aggiunti di 200 µl di Buffer AL e di 20µl di Proteinasi K. Si è quindi lasciato incubare a 56°C per 10 minuti;
- sono stati aggiunti 200 µl di etanolo (96-100%)
- i campioni sono stati trasferiti in una provetta da 2 ml con filtro separatore in grado di legare gli acidi nucleici (spin column fornita dal kit di estrazione) e centrifugati a 8000 rpm per 1 minuto; la colonnina con il filtro è quindi stata trasferita in una nuova provetta da 2 ml e la provetta contenente il filtrato eliminata;
- sono stati aggiunti 500 µl di buffer AW1; centrifugati a 8000 rpm per 1 minuto, e nuovamente si è trasferita la colonnina con il filtro in una nuova provetta da 2 ml gettando la provetta contenente il filtrato;
- sono stati aggiunti 500 µl di buffer AW2; centrifugati a 14000 rpm per 3 minuti, trasferita colonnina in una nuova provetta da 1.5 ml e gettata la provetta contenente il filtrato;
- si sono aggiunti 100 µl di buffer AE, e dopo incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto e centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto, la colonnina è stata eliminata ottenendo così nella provetta da 1.5 ml l'estratto desiderato

3.2.2 Estrazione di acidi nucleici totali da biopsia epatica

L'estrazione è stata condotta utilizzando un Kit commerciale. (*QIAGEN*, Milano, Italia), ed in particolare:

- 200 µl di Buffet ATL sono stati aggiunti al tessuto epatico proveniente dalla biopsia, si sono aggiunti 20 µl di proteinasi K e si è lasciato incubare a 56°C over night e comunque per il tempo necessario alla disgregazione del tessuto;
- sono stati aggiunti 200 µl di etanolo (96-100%);
- i campioni sono stati trasferiti in una provetta da 2 ml con filtro separatore in grado di legare gli acidi nucleici (*Spin Column* fornita dal kit di estrazione) e centrifugati a 8000 rpm per 1 minuto; la colonnina con il filtro è quindi stata trasferita in una nuova provetta da 2 ml e la provetta contenente il filtrato eliminata;
- sono stati aggiunti 500 µl di buffer AW1; centrifugati a 8000 rpm per 1 minuto, e nuovamente si è trasferita la colonnina con il filtro in una nuova provetta da 2 ml gettando la provetta contenente il filtrato;
- sono stati aggiunti 500 µl di buffer AW2; centrifugati a 14000 rpm per 3 minuti, trasferita colonnina in una nuova provetta da 1.5 ml e gettata la provetta contenente il filtrato;
- si sono aggiunti 100 µl di buffer AE, e dopo incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto e centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto, la colonnina è stata eliminata ottenendo così nella provetta da 1.5 ml l'estratto desiderato.

Per verificare l'efficienza di estrazione è stato incluso, ad ogni ciclo estrattivo, un campione ottenuto da un paziente viremico con infezione cronica da HBV, come controllo positivo.



3.2.3 Metodica di Amplificazione della regione S di HBV

La regione S di HBV è stata amplificata mediante una Nested-PCR, che prevede 2 reazioni di amplificazione successive utilizzando coppie di primers differenti, una più esterna (primers outer) e una più interna (primers inner).

La mix del primo step di amplificazione è così composta (volume finale 50 µl):

Componenti	Quantità	Concentrazione finale
DNA	10µl	-
Tampone 10X	5µl	1X
MgCl ₂ 25mM	3µl	1,5mM
dNTPs 10mM	2µl	0,4mM
MD14 10µM	2µl	0,4µM
MD13 10µM	2µl	0,4µM
Taq DNA polimerasi (5U/µl)	0,5µl	2,5U
H ₂ O sterile	25,5µl	-

La mix del secondo step di amplificazione è così composta (volume finale 50 µl):

Componenti	Quantità	Concentrazione finale
DNA outer	5µl	-
Tampone 10X	5µl	1X
MgCl ₂ 25mM	3µl	1,5mM
dNTPs 10mM	2µl	0,4mM
MD06 10µM	2µl	0,4µM
MD03 10µM	2µl	0,4µM
Taq DNA polimerasi (5U/µl)	0,5µl	2,5U
H ₂ O sterile	30,5µl	-

Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati sono:

MD14 (senso outer) 5'-CATCTTCTTGGTTGGTTCTT-3'

MD13 (antisenso outer) 5'-TTAGGGTTCAAATGTATA-3'

MD06 (senso inner) 5'-AATTCCTATGGGAGTGGG-3'

MD03 (antisenso inner) 5'-CCCAATACCACATCATCC-3'

Il frammento di DNA amplificato è di 126 bp

I fase di amplificazione (outer-PCR):

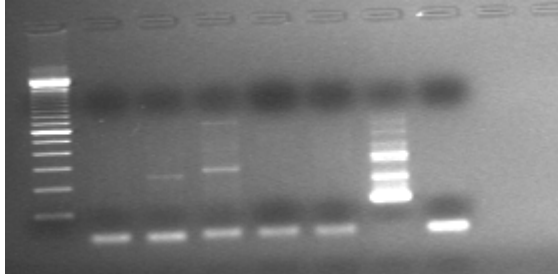
- Ciclo di denaturazione a 94°C per 10 minuti.
- 38 cicli di amplificazione: denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 60°C per 45 secondi, allungamento a 72°C per 30 secondi.
- Ciclo di allungamento a 72°C per 5 minuti

II fase di amplificazione (inner-PCR):

- Ciclo di denaturazione a 94°C per 5 minuti.
- 38 cicli di amplificazione: denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 50°C per 30 secondi, allungamento a 72°C per 30 secondi
- Ciclo di allungamento a 72°C per 5 minuti.

In Figura 1.1 è possibile vedere un esempio del risultato dell'amplificazione della regione S di HBV

Figura 1.1: Nested-PCR della regione S di HBV 5 HCV (C1; C2; C3; C4; C5) + 1 controllo positivo (A+) + 1 controllo negativo (A-)



M C1 C2 C3 C4 C5 A+ A-

3.2.4 Metodica di Amplificazione della regione Pre-core/Core di HBV

La regione Pre-core/Core di HBV è stata amplificata mediante una Nested-PCR, che prevede 2 reazioni di amplificazione successive utilizzando coppie di primers differenti, una più esterna (primers outer) e una più interna (primers inner).

La mix del primo step di amplificazione è così composta (volume finale 50 µl):

Componenti	Quantità	Concentrazione finale
DNA	10µl	-
Tampone 10X	5µl	1X
MgCl ₂ 25mM	3µl	1,5mM
dNTPs 10mM	2µl	0,4mM
PRE-C 10µM	2µl	0,4µM
MD25 10µM	2µl	0,4µM
Taq DNA polimerasi (5U/µl)	0,5µl	2,5U
H ₂ O sterile	25,5µl	-

La mix del secondo step di amplificazione è così composta (volume finale 50 µl):

Componenti	Quantità	Concentrazione finale
DNA outer	5µl	-
Tampone 10X	5µl	1X
MgCl ₂ 25mM	3µl	1,5mM
dNTPs 10mM	2µl	0,4mM
hbv1858Fw	2µl	0,4µM
hbv1928Rv	2µl	0,4µM
Taq DNA polimerasi (5U/µl)	0,5µl	2,5U
H ₂ O sterile	30,5µl	-

Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati sono:

Pre-C(senso outer) 5'- G GGG AGG AGA TTA GGT TAA - 3'

MD25(antisenso outer) 5'- AAG GAA AGA AGT CAG AAG G - 3'

hbv1858Fw(senso inner) 5'- CAC TGT TCA AGC CTC CAA GCT -3'

hbv1928Rv(antisenso inner) 5'-CAA ATT CTT TAT AAG GGT CAA TGT CAA T-3'

Il frammento di DNA amplificato è di 71 bp.

I fase di amplificazione (outer-PCR):

- Ciclo di denaturazione a 94°C per 5 minuti.
- 38 cicli di amplificazione: denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 55°C per 30 secondi, allungamento a 72°C per 30 secondi.
- Ciclo di allungamento a 72°C per 5 minuti

II fase di amplificazione (inner-PCR):

- Ciclo di denaturazione a 94°C per 5 minuti.
- 38 cicli di amplificazione: denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 55°C per 30 secondi, allungamento a 72°C per 30 secondi
- Ciclo di allungamento a 72°C per 5 minuti.

L'amplificazione della regione del Core di HBV è particolarmente ostica, si è quindi scelto di procedere amplificando prima una porzione più piccola della regione, in quanto essendo il frammento più piccolo la tecnica è più sensibile: i campioni positivi sono poi stati sottoposti successivamente all'amplificazione del frammento più grande.

3.2.5 Metodica di Amplificazione della regione X di HBV

La regione X di HBV è stata amplificata mediante una Emi-Nested-PCR, che prevede 2 reazioni di amplificazione successive utilizzando primers senso uguali sia per l'outer che per l'inner e primers anti-senso differenti.

La mix del primo step di amplificazione è così composta (volume finale 50 µl):

Componenti	Quantità	Concentrazione finale
DNA	10µl	-
Tampone 10X	5µl	1X
MgCl ₂ 25mM	3µl	1,5mM
dNTPs 10mM	2µl	0,4mM
MD24 10µM	2µl	0,4µM
MD29 10µM	2µl	0,4µM
Taq DNA polimerasi (5U/µl)	0,5µl	2,5U
H ₂ O sterile	25,5µl	-

La mix del secondo step di amplificazione è così composta (volume finale 50 µl):

Componenti	Quantità	Concentrazione finale
DNA outer	5µl	-
Tampone 10X	5µl	1X
MgCl ₂ 25mM	3µl	1,5mM
dNTPs 10mM	2µl	0,4mM
MD24 10µM	2µl	0,4µM
MD26 10µM	2µl	0,4µM
Taq DNA polimerasi (5U/µl)	0,5µl	2,5U
H ₂ O sterile	30,5µl	-

Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati sono:

MD24 (senso outer) 5'-AACTGGATCCTGCGCGGG-3'
MD26 (antisenso inner) 5'-GTTACGGTGGTCTCCAT-3'
MD29 (antisenso outer) 5'-TTAATCTAGTCTCCTCCCC-3'

Il frammento di DNA amplificato è di 230 bp

I fase di amplificazione (outer-PCR):

- Ciclo di denaturazione a 94°C per 5 minuti.
- 38 cicli di amplificazione: denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 50°C per 30 secondi, allungamento a 72°C per 30 secondi.
- Ciclo di allungamento a 72°C per 5 minuti

II fase di amplificazione (inner-PCR):

- Ciclo di denaturazione a 94°C per 5 minuti.
- 38 cicli di amplificazione: denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 50°C per 30 secondi, allungamento a 72°C per 30 secondi
- Ciclo di allungamento a 72°C per 5 minuti

3.2.6 Metodica di Amplificazione della regione PreS1/S2 di HBV

La regione PreS1/S2 di HBV è stata amplificata mediante una Nested-PCR, che prevede 2 reazioni di amplificazione successive utilizzando coppie di primers differenti, una più esterna (primers outer) e una più interna (primers inner).

La mix del primo step di amplificazione è così composta (volume finale 50 µl):

Componenti	Quantità	Concentrazione finale
DNA	10µl	-
Tampone 10X	5µl	1X
MgCl ₂ 25mM	3µl	1,5mM
dNTPs 10mM	2µl	0,4mM
P1 10µM	2µl	0,4µM
S1-2 10µM	2µl	0,4µM
Taq DNA polimerasi (5U/µl)	0,5µl	2,5U
H ₂ O sterile	25,5µl	-

La mix del secondo step di amplificazione è così composta (volume finale 50 µl):

Componenti	Quantità	Concentrazione finale
DNA outer	5µl	-
Tampone 10X	5µl	1X
MgCl ₂ 25mM	3µl	1,5mM
dNTPs 10mM	2µl	0,4mM
2823Fw	2µl	0,4µM
3098Rv	2µl	0,4µM
Taq DNA polimerasi (5U/µl)	0,5µl	2,5U
H ₂ O sterile	30,5µl	-

Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati sono:

P-1(senso outer) 5'- TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA- 3'
S1-2(antisenso outer) 5'- CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC- 3'
2823(senso inner) 5'- TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAAGA-3'
3098(antisenso inner) 5'-GCA GGA GGC GGA TTT GCT-3'

Il frammento di DNA amplificato è di 230 bp

I fase di amplificazione (outer-PCR):

- Ciclo di denaturazione a 94°C per 5 minuti.
- 38 cicli di amplificazione: denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 50°C per 30 secondi, allungamento a 72°C per 30 secondi.
- Ciclo di allungamento a 72°C per 5 minuti

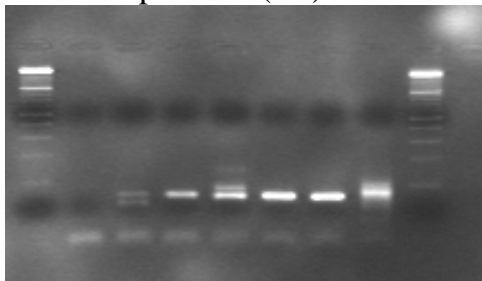
II fase di amplificazione (inner-PCR):

- Ciclo di denaturazione a 94°C per 5 minuti.
- 38 cicli di amplificazione: denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 50°C per 30 secondi, allungamento a 72°C per 30 secondi
- Ciclo di allungamento a 72°C per 5 minuti

Sia per l'HBV-DNA estratto da biopsia epatica che per quello estratto da siero o plasma è stato necessario valutare se l'estrazione avesse funzionato correttamente.

A questo scopo alcuni estratti sono stati sottoposti ad amplificazione del gene GAPDH, un gene ubiquitario la cui amplificazione viene spesso utilizzata per valutare la qualità del DNA estratto. Il risultato ottenuto ci ha permesso di affermare che la metodica di estrazione funziona correttamente sia da plasma che da biopsia (Figura 1.2). Viene sotto riportata la metodica di amplificazione del GAPDH.

Figura 1.2: PCR del gene GAPDH da estratti da biopsie (B1; B2; B3; B4; B5) + 1 controllo positivo (E+) + 1 controllo negativo di amplificazione (A-)



M A- E+ B1 B2 B3 B4 B5 M

3.2.7 Metodica di Amplificazione GAPDH

Il gene GAPDH di HBV è stato amplificato mediante una PCR, che prevede una singola reazione di amplificazione utilizzando una coppia di primers.

La mix dello step di amplificazione è così composta (volume finale 50 µl)

Componenti	Quantità	Concentrazione finale
DNA	5µl	-
Tampone 10X	5µl	1X
MgCl ₂ 25mM	4µl	2mM
dNTPs 10mM	4µl	0,8mM
GAPDH-1 10µM	2.5µl	0,5µM
GAPDH-2 10µM	2.5.µl	0,5µM
Taq GOLD (5U/µl)	0,5µl	2,5U
H ₂ O sterile	26,5µl	-

Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati sono:

GAPDH/1 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'

GAPDH/2 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3

Il frammento di DNA amplificato è di 175 bp

Fase di amplificazione :

- Ciclo di denaturazione a 94°C per 10 minuti.
- 38 cicli di amplificazione: denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 60°C per 45 secondi, allungamento a 72°C per 1 minuto.
- Ciclo di allungamento a 72°C per 10 minuti

3.2.8 Analisi di Sequenza

Gli amplificati sono stati analizzati mediante semina su gel di Agarosio all'1%. Il gel è stato sottoposto a corsa elettroforetica a 130Volts per 30 minuti in buffer TBE 1X. I campioni dopo la corsa sono stati visualizzati sottoponendoli ad esposizione a lampada UV (*Quantity One*). Gli amplificati dei campioni OBI positivi sono stati sottoposti a purificazione su colonna *MICROCON* effettuando due successivi lavaggi al fine di ottenere un eluato finale di 10µl, contenente l'amplificato privato dei componenti della Mix. Il materiale così purificato è stato sottoposto a seccaggio: le strips contenenti i campioni sono state inserite in termociclature a 70°C per 30 minuti. Il purificato, a questo punto secco, è stato sottoposto a sequenziamento diretto.

I ferogrammi ottenuti dal sequenziamento diretto hanno dato come risultato sequenze nucleotidiche che sono state allineate mediante il programma *Clustal X*;

con lo stesso programma è stato anche possibile tradurre le sequenze nucleotidiche in amminoacidiche ed allinearle. Le sequenze ottenute sono state allineate tra di loro e con una serie di prototipi disponibili su *Gene Bank*. Con le suddette sequenze sono stati costruiti alberi filogenetici mediante l'utilizzo dei programmi *Print-Tree* e *BioEdit*.

3.3 Valutazione Immunologica

3.3.1 Isolamento di cellule mononucleate

A partire da 20 ml di sangue periferico le cellule mononucleate sono state isolate come di seguito descritto.

- Ciascun campione, diluito 1:1 con tampone fosfato, è stato gradientato su 15 ml di Ficoll.
- Il sangue così stratificato è stato centrifugato per 30' a 1700 RPM a 20-22° C.
- Al termine della centrifuga è così stato ottenuto, al limite con il Ficoll, un anello di cellule (le mononucleate). Tali cellule sono state raccolte in un'altra Falcon e portate a volume di 50 ml con PBS 1X all'1% di FBS e quindi sottoposte ad un primo lavaggio centrifugandole a 1700 rpm per 10 min. a 20-22°C.
- Al termine della centrifuga il sovrantante è stato eliminato e si è proceduto ad un nuovo lavaggio risospesando prima il pellet in volume di 2-3 ml di PBS e poi riportando a volume di circa 50 ml. Il secondo ed ultimo lavaggio è stato nuovamente fatto a 1700 RPM per 10' a 20-22° C.
- Al termine il sovrantante è stato eliminato e le cellule sono state risospese in un volume di 5 ml (o 10 ml a seconda della consistenza del pellet) di RPMI +10 % FCS o PBS, per procedere alla conta.
- Per la conta cellulare è stato utilizzato il colorante *Trypan Blu*, che consente la differenziazione e dunque la conta delle cellule vitali. Il colorante è stato posto in concentrazione 1:10, e la conta è stata effettuata con camera monouso Kova Slide
- Effettuata la conta, i campioni sono stati nuovamente centrifugati a 1700 RPM per 10' a 4°C ed il pellet è stato risospeso in una soluzione di freezing,

preparata con Fetal Bovine Serum (Gibco, Milano, Italia) addizionato di Dimetilsolfossido (Sigma Aldrich, Milano, Italia) al 10%. Il pellet cellulare è stato suddiviso in modo da ottenere aliquote cellulari da circa 10 milioni di cellule mononucleate.

- . La criopreservazione è stata effettuata in contenitore Criobox (*Nalgene, Milano, Italia*), contenente 250 mL di alcol isopropilico (*Carlo Erba, Miano, Italia*), e garantisce la riduzione della temperatura progressivamente e lentamente, alla velocità di 1 grado al minuto. Il congelamento è stato pertanto effettuato a -80°C, quindi il giorno successivo le aliquote cellulari sono state spostate in azoto liquido (-196°C) per la conservazione a lungo termine, ed in particolare fino all'effettuazione del test.

3.3.2 Generazione delle linee HBV-specifiche

Sulla base delle evidenze riportate in letteratura, è stato utilizzato lo stesso approccio in uso per lo studio del profilo immunitario in corso di infezione cronica, e dunque lo sviluppo di linee T cellulari. E' difatti noto come i linfociti HBV specifici in corso di epatite cronica, se presenti, sono quasi completamente anergici, ed incapaci di esplicare le proprietà antivirali; la generazione di linee cellulari ha dunque lo scopo di far sì che, mediante l'aggiunta dei peptidi virali, le cellule specifiche proliferino in seguito alla stimolazione e si espandano clonalmente, aumentando le possibilità di rilevarne la presenza mediante test funzionali, che si basano sulla capacità di produzione di citochine.

Per la stimolazione HBV specifica sono stati utilizzati complessivamente 15 milioni di PBMCs. Di questi, il 50%, è stato destinato a funzionare come "cellule presentanti l'antigene" (APC) in quanto la componente mononucleata ottenuta dal gradiente contiene cellule in grado di esplicare tale attività: monociti e linfociti B. Tale proporzione è stata dunque trattata col peptide affinché questo venisse inglobato e presentato alla restante parte dei linfociti, impiegata a costituire la componente effettrice. In dettaglio, le cellule venivano centrifugate a 1500 rpm per 10 minuti. Al termine della centrifugazione, veniva eliminato il sovrantante e nella parte di volume rimanente (solitamente 200-300 µl) venivano aggiunti 20 µl del

pool costituito da tutti i singoli peptidi sintetici overlapping (OLP) alla concentrazione di 0.2 mg/ml. La stimolazione avveniva per un'ora e mezza in termostato (5% CO₂, 37 °C). Al termine dell'incubazione le cellule venivano lavate al fine di rimuovere il pool di peptidi e venivano unite alla restante parte di cellule (cellule effettrici) non stimolate. Entrambe le componenti venivano risospese in terreno RPMI addizionato come precedentemente indicato e seminate in piastre per colture cellulari (*Nunc, Rochester, NY, USA*) da 24 pozzetti. La coltura proseguiva in termostato per due settimane e comportava dopo 72 ore l'aggiunta di Interleuchina-2 alla concentrazione di 50 UI/mL (*IL-2, Roche, Milano Italia*). Per il mantenimento della coltura era necessario il cambio di terreno R10 arricchito di IL-2 circa due volte alla settimana.

3.3.3 Elispot con Peptidi Sintetici HBV-Specifici

- **Coattamento della piastra.** Sono state utilizzate piastre per *ELIspot* (*Multiscreen Millipore, Bedford, U.S.A*) con membrana di nitrocellulosa. E' stata effettuata una diluizione 1:500 dell'anticorpo *Coating* (*Anti-Human mAb 1-DK, Mariemont, USA*) aggiungendo a 10 mL di PBS 20µl di anticorpo per ciascuna piastra. Tale soluzione è stata dispensata, in 100µl per pozzetto. Le piastre così coattate sono state conservate a 4°C e utilizzate dopo 24 ore.
- **Preparazione della piastra.** Sono stati utilizzati peptidi sintetici sovrapposti, costituiti da 18-20 unità amminoacidiche ciascuno, in grado di coprire l'intero proteoma virale. La piastra coattata è stata lavata con PBS 1% FCS per 6 volte, dispensando ogni volta 200 µL per pozzetto. Sono quindi stati aggiunti 30 µL di R10 ad ogni pozzetto. I peptidi in pools sono stati dispensati nei pozzetti e infine sono state aggiunte, per ciascun pozzetto, 100 µL di sospensione cellulare. La piastra è quindi stata lasciata overnight nel termostato a 37°C.
- **Sviluppo della piastra.** Il primo passaggio dello sviluppo immunoenzimatico ha previsto l'utilizzo dell'anticorpo biotinilato alla diluizione di 1:2000 (100 µL). La piastra è stata lasciata incubare per 1h a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, è stata svuotata dell'anticorpo e lavata

con PBS 1X per 6 volte, ed aggiunta la soluzione di streptavidina (Mabtech, Mariemont, USA), alla diluizione di 1:2000 (100 μ L). Dopo un'ora di incubazione a temperatura ambiente, al buio, veniva aggiunto il substrato cromogeno; (BCIP/NBT – Biorad, Milano, Italia), fino allo sviluppo della reazione colorimetrica, che consiste nella formazione di spot blu sulla membrana del pozzetto. La reazione usualmente impiega circa 15 minuti, e veniva fermata quando ritenuto opportuno mediante l'aggiunta di Tween 20 e il lavaggio con acqua corrente.

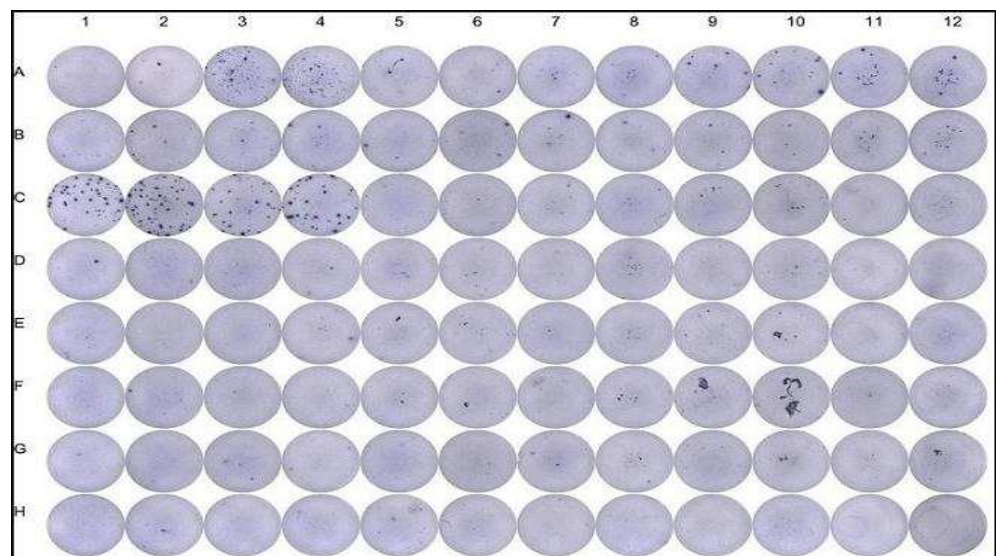
- **Lettura della piastra e analisi dei risultati:**

La lettura della piastra è stata eseguita mediante Elispot Reader, AID ELISpot Reader (*Autoimmun Diagnostika, Germany*).

Il calcolo del “background”, ossia della reazione linfocitaria aspecifica, è stato effettuato calcolando i seguenti valori numerici:

- a. tre volte il valore della media degli spot dei pozzetti negativi
- b. tre volte il valore della deviazione standard dei pozzetti negativi sommato alla media.

Fra i due valori numerici ottenuti, veniva scelto come valore soglia quello più alto; veniva pertanto considerato positivo ogni valore di numero di spot eccedente il valore soglia.



3.3.4 Analisi Statistica

I risultati sono espressi come mediana \pm IQR. L'analisi statistica è stata effettuata attraverso test statistici non parametrici (Wilcoxon test per dati appaiati e il Mann Whitney test per dati indipendenti). E' stato considerato significativo un valore di $p < 0.05$. L'analisi statistica è stata condotta mediante il software SPSS per Windows (11.0.1).

4. RISULTATI

4.1 *Risultati Virologici*

4.1.1 Amplificazione delle Regioni di HBV

La rilevazione dell'HBV DNA sia sierico che intraepatico ha, come detto, richiesto l'amplificazione mediante Home Made Nested-PCR di tre regioni HBV: S, pre-Core/Core e X.

In conformità a quanto stabilito dalla letteratura sull'argomento, sono stati definiti **OBI positivi** quei campioni che hanno mostrato positività per almeno due su tre delle regioni amplificate. Nessun soggetto in studio, né affetto da epatopatia ad eziologia virale (HCV) né affetto da epatopatia ad eziologia non virale (NASH e CRIPTO) ha mostrato positività per OBI nel plasma. Nessun soggetto affetto da epatopatia ad eziologia non virale ha mostrato positività per OBI a livello intraepatico. Al contrario 8 su 42 (**19%**) dei soggetti affetti da HCV hanno mostrato positività per OBI a livello intraepatico. Dei 42 soggetti affetti da HCV 16 erano anti-HBc positivi e di questi il **31%** (5/16) erano OBI-positivi, 26 erano anti-HBc negativi e di questi l'**11%** (3/26) erano OBI positivi.

In Tabella 1 sono stati riassunti i soggetti HCV OBI-positivi, il loro profilo sierologico relativo all'infezione da HBV, e le regioni HBV per le quali hanno mostrato o meno positività.

TABELLA 1:

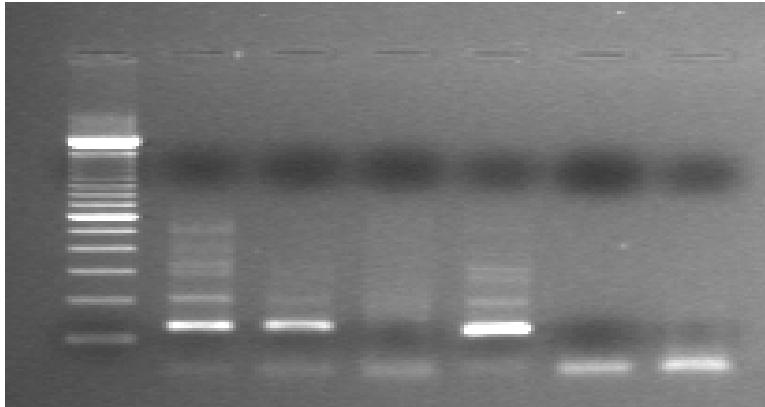
	HBsAg	HBcAb	HBeAb	S region	Pre-core region	X region
C8	neg	neg	neg	POS	POS	neg
C26	neg	neg	neg	POS	POS	neg
C29	neg	neg	neg	neg	POS	POS
C30	neg	POS	neg	POS	neg	POS
C34	neg	POS	POS	POS	POS	neg
C42	neg	POS	neg	POS	POS	neg
C43	neg	POS	neg	POS	POS	neg
C44	neg	POS	neg	neg	POS	POS

I campioni che sono risultati OBI positivi sono inoltre stati sottoposti ad amplificazione della regione PreS1/S2 al fine di poter valutare il genotipo HBV. In Figura 2.5 sono riportati esempi di campioni positivi e negativi alla regione PreS1/S2 di HBV.

I 10 campioni di pazienti affetti da infezione cronica da HBV (HBsAg e HBV-DNA positivi), utilizzati pertanto come controlli positivi, sono risultati positivi a tutte le regioni virali amplificate, come atteso.

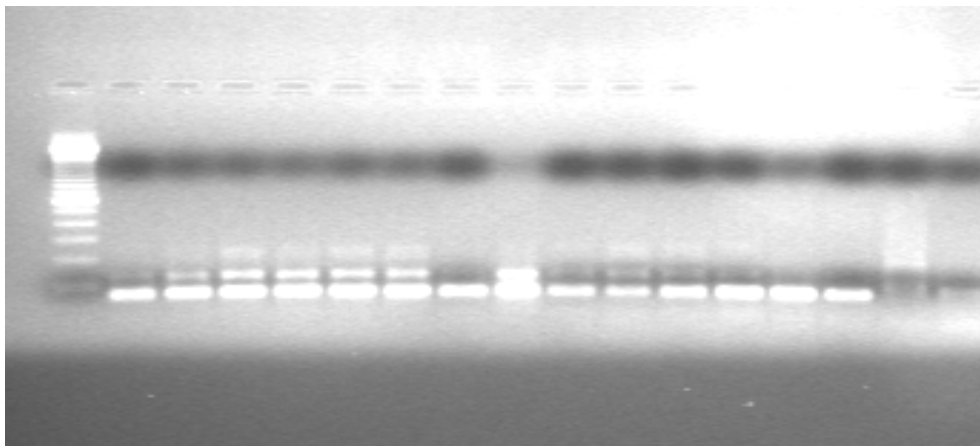
Vengono di seguito riportati esempi di campioni positivi e negativi a ciascuna delle regioni in studio.

Figura 2.1: campioni positivi e negativi alla regione S di HBV (M=Marker; C1 e C2=campioni positivi; C3=campione negativo; A+=controllo positivo di amplificazione, E-=controllo negativo di estrazione, A-=controllo negativo di amplificazione).



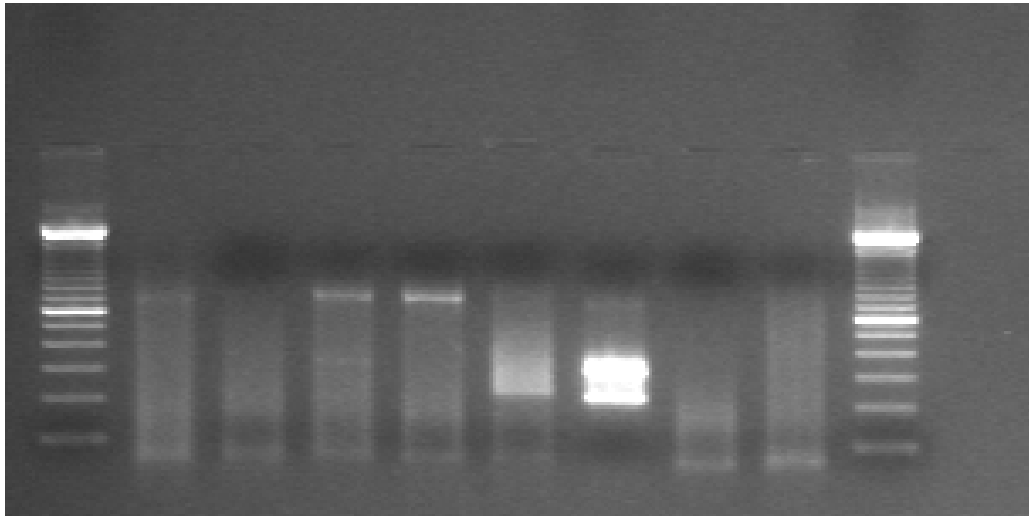
M C1 C2 C3 A+ E- A-

Figura 2.2: campioni positivi e negativi alla regione Pre-core/Core di HBV(M=marker; C1-C6=campioni positivi; C7=campione negativo; C8-C12=campioni positivi; C13,C14=campioni negativi; A+=controllo positivo di amplificazione; A-=controllo negativo di amplificazione).



M C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C13 C14 A+ A-

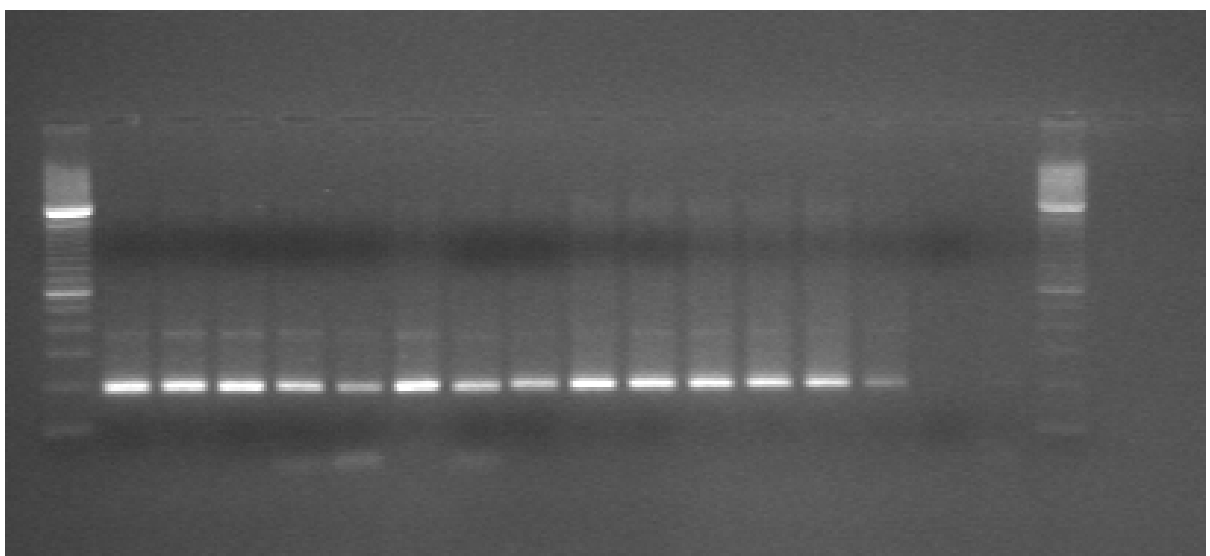
Figura 2.3: campioni positivi e negativi alla regione X di HBV (M=markers; C1-C4=campioni negativi; C5,C6=campioni positivi; E-=controllo negativo di estrazione; A-=controllo negativo di amplificazione).



M C1 C2 C3 C4 C5 C6 E- A- M

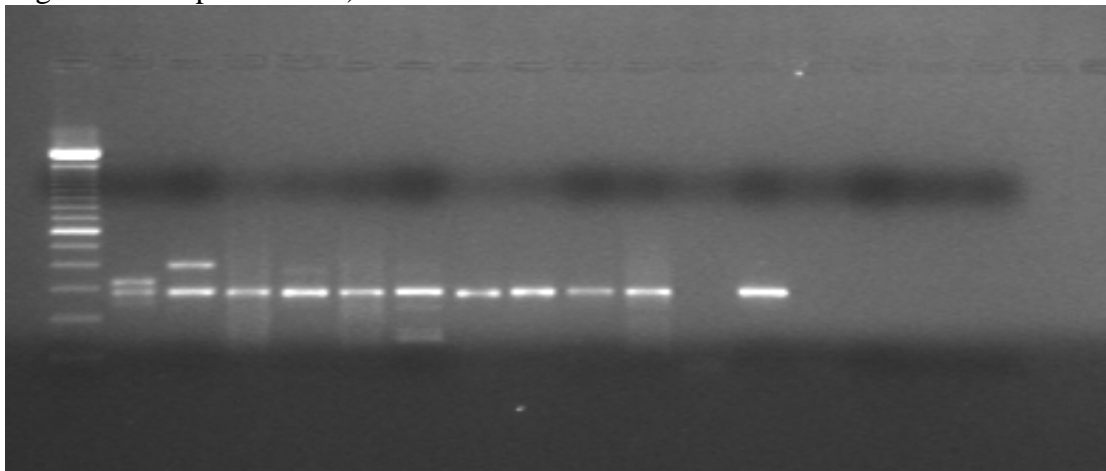
Prima di essere amplificati per le regioni di HBV di interesse, gli estratti sono stati valutati relativamente alla qualità dell'HBV-DNA estratto mediante Simple-PCR del gene GAP-DH (GAP-DH è un gene ubiquitario spesso impiegato in biologia molecolare per valutare la qualità del DNA estratto da tessuto).

Figura 2.4: campioni positivi e negativi all'amplificazione del GAP-DH(M=marker; C1-C13=campioni positivi; A+=controllo positivo di amplificazione; A-=controllo negativo di amplificazione; E-=controllo negativo di estrazione).



M C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11C12C13A+ A- E- M

Figura 2.5: campioni positivi e negativi all'amplificazione della regione PreS1/S2 di HBV (M=marker; C1-C9=campioni positivi; E+=controllo positivo di estrazione; E-=controllo negativo di estrazione; A+=controllo positivo di amplificazione; A-=controllo negativo di amplificazione).



M C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 E+ E- A+ A-

4.1.2 Analisi di Sequenza

I soggetti OBI positivi sono stati sottoposti a sequenziamento diretto (*Bmr-Genomics*, Padova, Italia) per valutare il profilo virologico caratterizzante l'infezione occulta ed in particolare la presenza di mutazioni a carico della regione S o di altre regioni di HBV, considerate responsabili della produzione di una proteina S mutata e conseguentemente dell'HBsAg negatività. I ferogrammi risultanti dal sequenziamento diretto sono stati utilizzati per ottenere, grazie al programma *Clustal X*, allineamenti, nucleotidici e amminoacidici, utili al fine di valutare le eventuali mutazioni caratteristiche dei soggetti OBI. Vengono sotto riportati alcuni esempi di allineamenti nucleotidici, amminoacidici e alberi filogenetici.(Figure 2.6; 2.7; 2.8; 2.9).

La costruzione dell'albero filogenetico (Figura 2.6) ci ha permesso di identificare che il genotipo HBV infettante in tutti i soggetti OBI positivi è il D, in conformità alla distribuzione epidemiologica caratteristica del bacino del Mediterraneo che individua nel genotipo D il genotipo prevalente della popolazione italiana. Tutti i pazienti risultati OBI positivi erano di fatti italiani. Analogamente, la quasi totalità (8/10) dei pazienti affetti da HBV è inoltre, come atteso, infettata dal genotipo D. Dall'allineamento nucleotidico (Figura 2.7), ottenuto dal confronto tra le sequenze dei campioni HCV/OBI positivi, con gli HBV e con un prototipo scaricato da

GeneBank è invece emerso che non è possibile individuare un pattern di mutazioni caratteristico per i soggetti affetti da OBI. Difatti anche là dove compaiono mutazioni puntiformi, ovvero sostituzioni di un singolo nucleotide, queste si presentano sia nei soggetti OBI che negli HBV e non è quindi possibile individuare un cluster di varianti; inoltre nessuna sostituzione nucleotidica determina la conversione di una tripletta codificante in uno stop-codon: non è quindi stato possibile individuare alcuna mutazione che possa essere ritenuta ragionevolmente responsabile della produzione di una proteina S mutata.

Figura 2.6: Albero Filogenetico ottenuto allineando le sequenze PreS1/S2 dei soggetti HCV/OBI positivi con le sequenze dei campioni HBV e con le sequenze prototipo scaricate da *GeneBank* rappresentative di tutti i genotipi HBV ad oggi identificati.

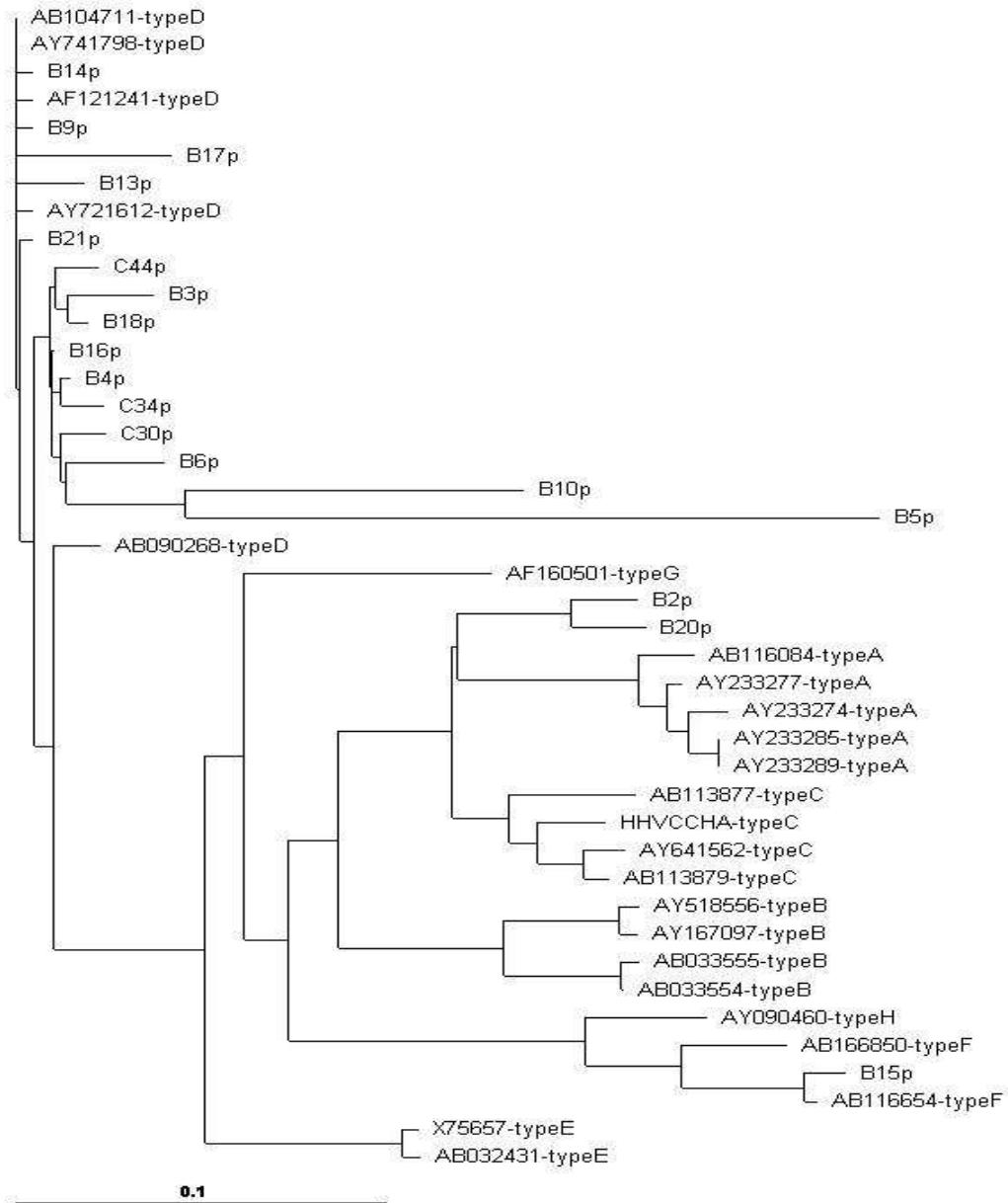


Figura 2.8: Allineamento delle sequenze amminoacidiche della regione S di HBV dei campioni HCV/OBI positivi con gli HBV e un prototipo genotipo D scaricato da *GeneBank*.

```

                10      20
      .....|.....|.....|.....|.....|...
AB090268      LVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYW
B4s           .....L.....
B16s          .....
B14s          .....
B5s           D.....
B10s          .....
B3s           .....
B17s          .....
C35s          .....I.....
B11s          .....I.....
B9s           .....I.....
B13s          .....
B6s           .....
B21s          .....
B18s          ..AV..R..P.....K....
C30s          .A.....E.....
C34s          .....
C42s          ..A.....I.....

```

Figura 2.9: Allineamento delle sequenze amminoacidiche della regione della Polimerasi di HBV dei campioni HCV/OBI positivi con gli HBV e un prototipo genotipo D scaricato da *GeneBank*.

```

                10      20
      .....|.....|.....|.....|.....|...
AB090268      TSAICSVVRRAFPCLAFSYMDDVVLG
B14s          .....
B5s           RR.....
B3s           .G.....
B9s           .....
B17s          .....
B10s          .....
B16s          .....
B11s          .....
B6s           .....
B21s          .....
B13s          .....
B4s           .....
B18s          A.GS..AL.T.....E....
C34s          .....
C42s          ..G.....
C30s          .....

```

Purtroppo non è stato possibile eseguire alcuna analisi di sequenza relativa alla regione Pre-core/Core di HBV. E' infatti da notare che non sempre ad un risultato di PCR qualitativamente positivo, corrisponde un ferogramma, sufficientemente chiaro da permettere un'analisi di sequenza sicura ed attendibile.

4.2 Dati Biochimici e Demografici

Per quanto i tre gruppi in studio siano numericamente differenti e relativamente esigui, i principali parametri socio-demografici e clinici indicano una certa sovrapposibilità delle caratteristiche dei tre gruppi in studio. Le uniche differenze statisticamente significative si registrano relativamente all'età, dal momento che i pazienti HCV presentano un'età più elevata sia relativamente ai pazienti NASH che a quelli affetti da epatopatia criptogenetica ($p=0.012$ e $p=0.004$, rispettivamente) (TABELLA 2). Inoltre, come largamente prevedibile, in quanto insito nelle caratteristiche patogenetiche e biochimiche della malattia, i pazienti affetti da NASH presentano valori di BMI più elevati sia rispetto ai soggetti affetti da HCV ($p= 0.000$) che rispetto ai pazienti CRIPTO ($p=0.001$) (TABELLA 2); e rispetto ai pazienti HCV mostrano una maggiore tendenza all'accumulo di colesterolo e di trigliceridi (rispettivamente $p=0.0410$ e $p=0.0083$) (TABELLA 2).

Parametri Clinici e Demografici dei pazienti al momento del test

TABELLA 2:

DATI CLINICI/DEMOGRAFICI	NASH N= 25	HCV N=42	CRIPTO N=7	P
SESSO	18M/7F	26M/16F	5M/2F	
ETA'	41.0 (33.5-54.0) ^{1,2}	56.0 (45.0-65.0) ¹	39.0 (36.0-42.0) ²	1 =0.012 2= 0.004
ALT	68.5 (54.0-87.3)	54.8 (33.9-83.7)	49.0 (46.5-95.5)	<i>ns</i>
AST	34.1 (30.1-39.6)	40.5 (27.8-51.5)	31.0 (27.0-39.0)	<i>ns</i>
GAMMA-GT	50.8 (32.5-71.5)	36.5 (22.1-50.0)	17.0 (14.0-39.5)	<i>ns</i>
COLESTEROLO	201.0 (171.0-232.5) ¹	170.0 (139.0-218.0) ¹	180.5 (176.5-193.5)	I=0.04
TRIGLICERIDI	153 (112.0-206.5) ¹	87.0 (67.0-140.0) ¹	86.5 (79.2-125.2)	0.002

GLUCOSIO	80 (74.0-88.0)	83.0 (77.0-91.0)	78.0 (74.5-85.5)	<i>ns</i>
BMI	30.1 (26.9-31.8) ^{1,2}	26.4 (24.6-28.0) ²	24.7 (22.8-25.9) ¹	<i>1= 0.001</i> <i>2= 0.000</i>

4.2.1 Parametri Clinici e Demografici OBI (8pz) vs nonOBI (66pz) e HCV/OBI (8 pz) vs HCV/nonOBI(34 pz)

Ai fini di stabilire come la presenza di OBI impatti sulla severità della malattia di fegato, si è proceduto al confronto tra i pazienti OBI e i pazienti non OBI. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative relativamente all'attività necroinfiammatoria e agli indici di colestasi. Pertanto la presenza di OBI non sembra determinare una maggiore progressione del danno epatico (Tabella 3)

Parametri Clinici e Demografici OBI (8pts) vs non OBI (66pts)

TABELLA 3:

DATI CLINICI	OBI MEDIANA	nonOBI MEDIANA	FISHER EXACT TEST
ETA'	58.0 (51.0-64.2)	47.0 (38.0-60.0)	<i>ns</i>
ALT	52.7 (33.3-76.5)	59.2 (39.3-88.2)	<i>ns</i>
AST	39.6 (31.2-53.3)	34.5 (28.0-47.5)	<i>ns</i>
GAMMA-GT	34.0 (20.3-55.2)	40.6 (22.1-58.0)	<i>ns</i>

Inoltre, dal momento che tutti i pazienti risultati positivi ad OBI sono affetti da infezione da HCV, si è proceduto al confronto tra la popolazione OBI positiva e OBI negativa nel gruppo dei pazienti HCV, in termini di caratteristiche virologiche (TABELLA 4), per stabilire se la coinfezione OBI ha un qualche ruolo sull'infezione da HCV.

In termini di risposta al trattamento antivirale per HCV, che i pazienti hanno intrapreso dopo la valutazione istologica, sette pazienti OBI sono stati trattati e 5 di essi sono risultati responsivi (71%). Tra i soggetti OBI negativi, in seguito

all'analisi istologica, hanno intrapreso il trattamento 26 pazienti, di cui 12 sono risultati responsivi (46%).

TABELLA 4:

	OBI POSITIVI N= 8	OBI NEGATIVI N= 34	<i>p</i>
GENOTIPO VIRALE gen 1/gen non 1	6/2	21/13	ns
%ECA/CIRROSI	0/8	2/32	ns
HCV-RNA [MEDIANA-RANGE]	828.000 (645.5709.249.500)	1.087.000 (151.000-4.652.000)	ns
NAIVE/ PRECEDENTEMENTE TRATTATI	7/1	31/3	ns

Infine, è stata anamnesticamente ricercata l'informazione nei pazienti OBI positivi circa l'eventuale familiarità per infezione da HBV: nessun paziente OBI positivo riportava anamnesi familiare positiva per questo dato.

4.3 Risultati Immunologici

Le indagini immunologiche, finora eseguite su 5 pazienti, hanno evidenziato in primo luogo che una risposta T cellulare HBV specifica può essere rilevata nel comparto periferico di pazienti con infezione occulta da HBV. Dei 5 pazienti in studio, 3 appartenevano al gruppo degli OBI positivi, mentre 2 pazienti erano OBI negativi (HCV positivi). Per quanto attiene ai 3 pazienti OBI positivi, tutti i pazienti erano anticore-positivi, e dunque mostravano segni di pregresso contatto con il virus. Tutte le quattro regioni del proteoma virale sono state bersaglio di risposta immune, senza un preferenziale target (TABELLA 5).

Di nota, mentre si è riscontrata sovrapposizione fra le regioni amplificate dal test virologico, e le regioni riconosciute dalla reattività T linfocitaria per quanto riguarda le componenti strutturali di HBV (core ed envelope), non si è trovata la stessa corrispondenza per le parti non strutturali. La risposta immunitaria verso le regioni X e polimerasi sono risultate particolarmente intense in termini di ampiezza, pertanto non si può escludere che dove sia presente una reattività elevata, ci sia una maggiore soppressione della replica virale e/o dell'espressione di tali antigeni.

Per quanto riguarda gli OBI negativi, i risultati finora prodotti hanno evidenziato una risposta intensa e multispecifica, dal momento che entrambi hanno riconosciuto diverse sequenze di distinte regioni virali (TABELLA 5). Mentre uno dei pazienti era anti-core positivo, e dunque la sua reattività antivirale poteva essere attesa, il risultato completamente inaspettato riguarda il riscontro di una risposta immune presente ed insualmente vigorosa per quanto attiene ad un paziente senza alcun segno di pregresso contatto con il virus (C16). La rivalutazione dell'indagine virologica ha evidenziato che in realtà questo paziente aveva presentato una positività per l'amplificazione alla regione S del virus, ma sulla base delle definizioni attualmente utilizzate, era stato classificato OBI negativo in quanto privo di positività concomitante per due regioni. Per quanto questo risultato isolato certamente meriti rivalutazione e necessita di essere confermato in altri casi, impone tuttavia grande attenzione ed offre almeno spunti di riflessione circa gli attuali criteri diagnostici, così come suggerisce la possibilità di multiple e sconosciute interazioni fra virus e risposta immune.

TABELLA 5:

	HCV/OBI	HBcAb	Risposta anti-S	Risposta anti-core	Risposta antiX	Risposta T anti polimerasi	Frequenza di risposta	Ampiezza complessiva
C34	pos	pos	Neg	pos	neg	neg	1	301
C29	pos	pos	Pos	neg	neg	neg	1	256
C42	pos	pos	Neg	neg	pos	pos	5	13962
C32	neg	pos	Pos	pos	pos	neg	4	1860
C16	neg	neg	Neg	neg	pos	pos	13	>10.000

Frequenza di risposta = numero di peptidi riconosciuti

Ampiezza complessiva = SFC/10⁶ PBMCs

5. DISCUSSIONE

L'infezione occulta da HBV costituisce un problema sanitario di grande rilevanza ed attualità e potenzialmente destinato ad aumentare in futuro, per le caratteristiche epidemiologiche tipiche dell'infezione da HBV. Mentre infatti l'incidenza dell'infezione è in decremento in molte aree geografiche, grazie alla disponibilità di una profilassi vaccinale efficace, la prevalenza di pazienti con segni di precedente contatto col virus è molto elevata. Grazie agli studi circa l'infezione occulta, è ormai chiaro come questi pazienti possano riattivare l'infezione in caso di immunosoppressione; oltre a questo, una parte di pazienti con infezione occulta risulta sieronegativa per tutti i marcatori HBV, eludendo pertanto ogni sospetto diagnostico. Oltre a questa possibilità, l'infezione occulta da HBV può avere un ruolo nelle trasfusioni e nei trapianti di organo, nell'insorgenza di HCC e mantiene pertanto un impatto clinico estremamente rilevante che merita la definizione dei meccanismi sottostanti, così come dell'effettiva entità del fenomeno, che non è stato ad oggi definitivamente chiarito.

Il primo risultato dello studio mostra che OBI non è rilevabile nel gruppo esaminato di pazienti affetti da epatopatia ad eziologia non virale (NASH e CRIPTO), né a livello plasmatico né intraepatico. Particolare interesse è stato rivolto alla valutazione della presenza di OBI in pazienti con malattia criptogenetica, dal momento che costituisce la proporzione di pazienti (approssimativamente il 5% del totale di pazienti con epatopatia cronica) in cui una chiara eziologia della malattia di fegato non viene identificata. Il risultato dello studio non è in linea con precedenti osservazioni [44], che dimostrano la presenza di infezione occulta nel 30% dei casi. Presumibilmente queste differenze possono giustificarsi con la selezione delle popolazioni in studio, in termine di tassi di prevalenza, ed esposizione a fattori di rischio. D'altra parte, non si può escludere che il risultato dello studio risenta della casistica estremamente esigua di cui si disponeva (7 pazienti), e andrebbe pertanto confermato su casistiche più ampie. L'unico gruppo di pazienti che ha mostrato positività per OBI è risultato essere quello dei pazienti affetti da infezione cronica da HCV a conferma di dati già presenti in letteratura [1;6;7;9;21]. OBI è stata

rilevata, a livello intraepatico, nel 19% dei pazienti affetti da HCV. Nei soggetti che sono risultati OBI positivi inoltre, a conferma di ulteriori dati già presenti in letteratura [5;6], l'analisi di sequenza non ha permesso di individuare un pattern caratteristico di mutazioni che identificasse e caratterizzasse i soggetti OBI positivi dai soggetti HBV cronici o dai prototipi presenti nelle banche dati (*GeneBank*). Infatti, le mutazioni puntiformi delle sequenze sia nucleotidiche che amminoacidiche, rilevate rispetto ai prototipi, sono presenti nei soggetti OBI esattamente come nei pazienti affetti da infezione cronica HBV. Inoltre, per quanto riguarda le sequenze nucleotidiche, nessuna delle mutazioni puntiformi rilevate è in grado di determinare la conversione di una tripletta codificante in uno stop codon,; allo stesso modo per le sequenze amminoacidiche, nessuna sostituzione sembra in grado di determinare l'alterazione della funzionalità proteica. Possiamo quindi concludere che nelle analisi di sequenza delle regioni S, Polimerasi e X di HBV, non è stata rilevata alcuna mutazione che possa essere ritenuta ragionevolmente responsabile della produzione di una proteina S mutata e quindi, conseguentemente dell'HBsAg negatività. Questo risultato conferma precedenti osservazioni che non hanno identificato sostanziali alterazioni nella sequenza virale fra OBI e non OBI, ma piuttosto una serie di modifiche epigenetiche caratterizzanti il virus responsabile di infezione occulta [45].

La valutazione dei principali parametri biochimici di malattia del gruppo OBI rispetto al gruppo non OBI ha mostrato che i soggetti OBI positivi non si caratterizzano per una malattia epatica più aggressiva dal punto di vista biochimico. Questa conclusione risente tuttavia di una serie di limitazioni: in primo luogo l'osservazione puntiforme, la natura cross-sectional dello studio, e la relativa disomogeneità della popolazione in studio, soprattutto in termini di storia di malattia. Va inoltre precisato che l'analisi è stata condotta in larga parte su pazienti affetti da epatite e non da cirrosi, dal momento che l'arruolamento si è basato sui pazienti che venivano sottoposti a biopsia epatica, e questo non ha consentito la valutazione del ruolo di OBI nelle forme più progredite di epatopatia. L'ampliamento della casistica, assieme ad un'osservazione longitudinale nel tempo, consentirà di pervenire a risultati maggiormente conclusivi da questo punto di vista.

Infine, una serie di lavori ha stabilito il ruolo di OBI nel trattamento per l'infezione da HCV, in alcuni casi trovando un'associazione fra la presenza di OBI e la non risposta al trattamento. Nello studio presente, OBI non sembra avere alcun impatto in termini di risposta antivirale, dal momento che 6 degli 8 (75%) OBI positivi che sono stati sottoposti a trattamento standard per HCV (interferone peghilato e ribavirina) hanno risposto al trattamento, contro il 46% dei pazienti non OBI.

Il punto di vista immunologico infine relativamente ad OBI è un aspetto di grande interesse, dal momento che è stato ipotizzato come l'infezione occulta derivi dall'inoculo con minime quantità di virus e dalla conseguente incapacità di montare una risposta immunitaria efficace e rilevabile [46]. I risultati dello studio, per quanto ancora estremamente preliminari, offrono notevoli spunti di interesse, che meritano ulteriore approfondimento. In primo luogo, a conferma di dati già disponibili in letteratura [8], i pazienti con infezione occulta hanno una reattività linfocitaria HBV-specifica. Non è stato riportato un diverso profilo immunologico fra pazienti anticore-positivi e pazienti anticore-negativi; è stata riscontrata sovrapposizione fra regioni amplificate e regioni riconosciute per le componenti strutturali del virus (core ed envelope), mentre la stessa sovrapposizione per la proteina X e polimerasi non è stata riscontrata. Le risposte contro queste stesse componenti inoltre, quando presenti, sono risultate di grande intensità, il che potrebbe suggerire che alcune risposte hanno un ruolo sulla replica e l'espressione antigenica virale. Infine, il risultato più inaspettato, è quello relativo alla presenza di una forte risposta immune antivirale in un paziente sierologicamente negativo per HBV e classificato come OBI negativo sulla base delle definizioni attuali: questa osservazione, se confermata in altri pazienti con lo stesso profilo siero-virologico, può sottendere alla definizione di differenti forme di infezione occulta.

Circa il problema della diagnosi di OBI, ad oggi esclusivamente possibile mediante biopsia epatica, i dati immunologici dello studio, benché preliminari, fanno intravedere la possibilità di disporre in futuro di un test diagnostico per OBI da effettuarsi su prelievo ematico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Occult Hepatitis B Virus Infection: Detection and Significance [*Gerlich W.; Bremer C.; Saniewski M.; Schuttler C.G.; Wend U.C.; Willems W.R.; Glebe D.*] Digestive Disease 2010;28:116-125;
- [2] Hepatitis B Virus Induced Hepatocellular Carcinoma [*Chemin I.; Zoulim F.*] Cancer Letters; 2009; 286:52-59;
- [3] Occult hepatitis B virus infection, [*Giovanni Raimondo, Teresa Pollicino, Irene Cacciola, Giovanni Squadrito*] Journal of Hepatology 2007; 46: 160-170;
- [4] Clinical impact of occult HBV infection, [*I. Chemin, C. Trèpo*] Journal of clinical virology 34 Suppl. 1(2005) S15-S21;
- [5] Statements from the *Thaormina* expert meeting on Occult Hepatitis B Virus Infection [*Raimondo G. et al*] Journal of Hepatology 2008; 49:652-657;
- [6] Occult Hepatitis B Infection: an evolutionary scenario [*Formijn J van Hemert, Hans L Zaaijer, Ben Berkhout, Vladimir V Lukashov*] Virology Journal 2008, 5:146;
- [7] A 2010 update on Occult hepatitis B Infection [*Raimondo G.; Pollicino T.; Romanò L.; Zanetti A.R.*] Pathologie Biologie 2010; 58:247-257;
- [8] The characteristics of the Cell-mediated Immune Response Identify Different Profiles of Occult Hepatitis B Virus Infection [*Zerbini A.; Pilli M.; Boni C.; Fiscaro P.; Pemma A.; Di Vincenzo P.; Giuberti T.; Orlandini A.; Raffa G.; Pollicino T.; Raimondo G.; Ferrari C.; Missale G.*] Gastroenterology 2008;
- [9] Occult hepatitis B virus and hepatitis C virus infection *Vicente Carreno, Javier Bartolomé, Inmaculada Castillo and Juan Antonio Quiroga* Rev. Med.Virol. 2008; 18: 139-157 ;
- [10] Occult Hepatitis B Virus Infection In Immunocompromised Patients *Ruth Nogueira Cordeiro Jardim, Neiva Sellan Lopes Goncales et al*, The Brazilian Journal of Infectious Disease 2008 12 (4) 300-305;
- [11] Diagnosis, Prevention and Management of hepatitis B Virus Reactivation During Anticancer Therapy [*Yeo W.; Jhonson P.J.*] hepatology 2006; 43:209-20;

- [12] Screening, Prevention and Treatment of Viral Hepatitis B Reactivation in Patients with Haematological Malignancies [*Lalazar G.; Rund D.; Shouval D.*] *Br. J. Haematol* 2007; 136:699-712;
- [13] Donor Screening for Antibody to Hepatitis Core Antigen and Hepatitis B Virus Infection in Transfusion Recipients [*Mosley JW.; Stevens CE.; Aach RD.; Hollinger FB.; Mimms L.; Solomon LR.; Barbosa LH.; Nemo GJ*] *Trasfusion* 1995; 35:5-12;
- [14] Type B Hepatitis after Transfusion with blood containing Antibody to Hepatitis B core Antigen [*Hoofnagle JH.; Seef LB.; Bales ZB.; Baker LF.*] *N. Eng. J. Med* 1978; 298:1379-1383;
- [15] Anticore Antibody Screening of Transfused blood [*Lander JJ.; Gitnick LGL.; Gelb LH.; Aach RD.*] *Vox Sang* 1978; 34:77-80;
- [16] Occult Hepatitis B Virus Infection: Implications in Trasfusion [*Allain J.P.*] *Vox Sanguinis* 2004; 86:83-91;
- [17] Occult hepatitis B Virus Infection [*Allain JP.*] *Trasfusion Clinique e Biologique* 2004; 11:18-25
- [18] Occult Hepatitis B Infection is Associated with the development of hepatocellular carcinoma in Chronic Hepatitis C Patients [*Suqadrito G.; Pollicino T.; Cacciola I.; caccamo G.; Villari D.; La Masa T.; Restuccia T.; Cucinotta E.; Scisca C.; Magazzu D.; Raimondo G.*] *cancer* 2006; 106:1326-1330
- [19] Hepatitis B Virus Maintains its Pro-Oncogenic Properties in the acse of Occult HBV Infection [*Pollicino T.; Squadrito G.; Cerenzia C.; Cacciola I.; raffa G.; Craxi A.; farinati F.; Missale G.; Smedile A.; Tiribelli C.; Villa E.; Raimondo G.*] *Gatroenterology* 2004; 126:102-110;
- [20] Occult Hepatitis B Virus Infection as a Risk factor for hepatocellular carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis [*Miura Y.; Shibuya A.; Adachi S.; Takeuchi A.; Tsihiashi T.; nakazawa T.; Saigenji K*] *Hepatol. Res* 2008; 38-546-556;
- [21] Occult Hepatitis B Virus Infection in Patients with Chronic Hepatitis C Liver Lisease [*Cacciola I.; Pollicino T.; Squadrito G.; Cerenzia G.; Orlando ME.; Raimondo G.*] *New Engl J. Med* 1999; 341:22-6;

- [22] Clinical Impact of Occult HBV Infection [*Chemin I.; Trepo C.*] Clin Virol 2005; 34:S15-21;
- [23] Hepatitis B Virus Induced Hepatocellular Carcinoma [*Chemin I.; Zoulim F.*] Cancer Lett 2009; 286:52-9;
- [24] HCV and HBV Coexist in HBsAg-negative Patients with HCV Viraemia: Possibility of Coinfection in these Patients must be Considered in HBV-High Endemic Area [*Lee Ds.; Huh K.; Lee EH.; Hong HS.; Sung YC.*] J Gastroenterol Hepatol 1997; 12:855-861;
- [25] Isolated Antibody to Hepatitis B Core Antigen in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection [*Hwlmy A.; Al-Sebayel M.I.*] World J. gastroenterol 2006; 12:4406-4410;
- [26] Isolated Antibody to Hepatitis B Core Antigen in Human Immunodeficiency Virus Type-1 Infected Individuals [*Ghandi RT.; Wurcel A.; Lee H.; McGovern B.; Gerwin R.; Corcoran CP.; Toner S.; Cohen DE.; Sax PE.; et al*] Clin Infect Dis 2003; 36:1602-1605;
- [27] Occult Hepatitis B Virus Infection and Clinical Outcome of Patients with Chronic Hepatitis C [*Kao JH.; Chen PJ.; Lai MY.; Chen DS.*] J. Clin Microbiol 2002; 40:4068-4071;
- [28] Nonalcoholic Steatohepatitis [*Ludwig J.; Viggiano TR.; McGill DB.; Ott BJ.*] Mayo Clin Proc 1980; 55:434-438;
- [29] Nonalcoholic Fatty Liver Disease: a Spectrum of Clinical and Pathological Severity [*Matteoni CA.; Younossi ZM.; Gramlich T.; Ong JP.; Hurley M.; Mullen KD.; et al.*] gastroenterology 1999; 116:1413-1419;
- [30] Nonalcoholic Fatty Liver Disease [*Clark JM.; Brabcati FL.; Dihel AM.*] gastroenterology 2002; 94:3010-3014;
- [31] Prognosis and Life Expectancy in Chronic Liver Disease [*Propst A.; Propst T.; Zangerl G.; Ofner D.; Judmaier G.; Vogel W.*] Dig Dis Sci 1995; 40:1805-1815;
- [32] Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference [*Brent A.; Neushwander-Tetri.; Stephen H.C.*] Hepatology, May 2003

- [33] Steatosis and Hepatitis C Virus: Mechanism and Significance for Hepatic and Extrahepatic Disease [*Lonardo A.; Adinolfi LE.; Loria P.; Carulli N.; Ruggiero G.; day CP.*] *gastroenterology* 2004; 126:586-597;
- [34] Prevalence and Predictive Factors of Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) in Morbidly Obese Patients Undergoing Bariatric Surgery [*Harnois F.; Msika S.; sabatè JM.; Mechler C.; Jouet P.; Barge J.; Coffin B.*] *Obes Surg* 2006; 16:138-188;
- [35] Hepatic Steatosis in Chronic Hepatitis B Patients is Associated with Metabolic Factors More than Viral Factors [*Peng D.; Han Y.; Ding H.; Wei L.*] *J Gastroenterology Hepatol* 2008; 23:1082-1088;
- [36] Impact of Non-Alcoholic Fatty Liver in Chronic Hepatitis B [*Bondini S.; Kallman J.; Wheeler A.; Prakash S.; Gramlich T.; Jondle DM.; Younossi ZM.*] *Liver Int* 2007; 27:607-611;
- [37] Metabolic Syndrome Increase the Risk of Liver Cirrhosis in Chronic Hepatitis B [*Wong GL.; Wong VW.; Choi PC.; Chan AW.; Chim AM.; Yiu KK.; Chan HY.; Chan FK.; Sung JJ.; Chan HL.*] *Gut* 2009; 58:111-117;
- [38] Steatosis as a Co-Factor in Chronic Liver Disease [*Persico M.; Iolascon A.*] *World J. Gastroenterology* 2010; 16:1171-1176;
- [39] Cryptogenic Cirrhosis and NAFLD: are they Related [*Maheshwari A.; Thuluvath PJ.*] *J Gastroenterology* 2006; 101:664-668;
- [40] NASH and Cryptogenic Cirrhosis: a Histological Analysis [*Caldwell SH.; Lee VD.; Kleiner DE.; Al-Osaimi AM.M Argo CK.; Northup PG.; Berg CL*] *Hepatology* 2009; 8:346-352;
- [41] Cryptogenic Cirrhosis: What Are We Missing [*Caldwell S.*] *Curr Gastroenterology Rep.* 2010; 12:40-8;
- [42] Occult hepatitis B Virus Infection and Cryptogenetic Chronic Hepatitis in an Area With Intermediate Prevalence of HBV Infection [*Kaviani M.; Behebahani B.; Mosallai MJ.; Sari-Aslani F.; Taghavi SA.*] *World Journal of gastroenterology* 2006; 12:5048-5050;
- [43] The Immune Response during Hepatitis B Virus Infection [*Bertoletti A. Gehring AJ.*] *J Gen. Virol.* 2006; 87:1439-49;

- [44] High Incidence of Hepatitis B Infections among Chronic Hepatitis Cases of Unknown Aetiology. [*Chemin I.; Zoulim F.; Merle P.; Archis A.; Chevallier M.; Kay A.; Cova L.; Chevallier P.; mandrand B.; Trèpo C.*] *J.Hepatol.* 2001; 34 (3):471-3;
- [45] High genetic variability of the group specific a-determinant of Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) and the Corresponding Fragment of The Viral Polymerase in Chronic Virus Carriers Lacking Detectable HBsAg in Serum [*Vivekanandan P.; Bauer T.; Bohm S.; et al*]
- [46] Persistence of Isolated Antibodies to Woodchuck Hepatitis Virus Core Antigen is Indicative of Occult Infection. [*Coffin CS.; Pham TN.; Mulrooney PM.; Cghurchill ND.; Michalak TI.*] *J. Hepatology* 2004; 40(5):1053-61;