A.I.S.F.

ASSOCIAZIONE ITALIANA PER LO STUDIO DEL FEGATO

10TH A.I.S.F. PRE-MEETING COURSE

MANAGEMENT OF HBV-RELATED LIVER DISEASE

Roma, 20 Febbraio 2008

Aula Magna Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

INDICE

PROGRAMMA 5

EPIDEMIOLOGY AND NATURAL HISTORY OF HEPATITIS B 7
Giovanna Fattovich, Michela Pasino

RISPOSTA IMMUNITARIA E PATOGENESI DELL'INFEZIONE DA HBV: IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE 15
Carlo Ferrari

RESISTENZA DELL'HBV AGLI ANTIVIRALI SPECIFICI: DEFINIZIONE, BASI MOLECOLARI, TESTS DIAGNOSTICI 21
G. Raimondo

TRATTAMENTO CON INTERFERONE DEL PAZIENTE CON EPATITE CRONICA B, HBEAG NEGATIVA 23
Maurizia Rossana Brunetto

TREATMENT OF HBEAG NEGATIVE CHRONIC HEPATITIS B WITH NA: RECOMMENDATIONS OF THE ITALIAN CONSENSUS WORKSHOP, STRESA 2007 29
Antonio Craxì

LA TERAPIA DELLA CIRROSI EPATICA COMPENSATA DA VIRUS B (HBV) 37
Vito Di Marco

MANAGEMENT CLINICO DELLA RESISTENZA AI NUCLEOS(T)IDI ANTI-HBV 41
Massimo Levrero

DECOMPENSATED LIVER DISEASE AND LIVER TRANSPLANTATION 47
Mario Angelico

PROPHYLAXIS IN ONCO-HAEMATOLOGY 49
Alfredo Marzano

Coinfezione HIV-HBV 55
Massimo Puoti

10th A.I.S.F. Pre-meeting Course
"Management of HBV-related liver disease"

Course Directors: P. Lampertico, *Milano* and T. Pollicino, *Messina*

SCIENTIFIC PROGRAMME

Wednesday, February 20

09.30-10.50 **Registration and entry questionnaire**

10.50-11.00 **Course presentation**
P. Lampertico - T. Pollicino

I Session

Chairpersons: M. Mondelli, *Pavia* - P. Pontisso, *Padova*

11.00-11.20 **Epidemiology and Natural History**
G. Fattovich, *Verona*

11.20-11.40 **Immune-response and HBV pathogenesis: therapeutic implications**
C. Ferrari, *Parma*

11.40-12.00 **HBV resistance: definitions, molecular basis, assays**
G. Raimondo, *Messina*

12.00-12.15 **Questions and answers**

II Session

Treatment of HBeAg positive CHB

Chairpersons: A. Ascione, *Napoli* - E. Villa, *Modena*

12.15-12.35 **Peg-IFN**
G.B. Gaeta, *Napoli*

12.35-12.55 **Nucleos(t)ide analogues**
T. Santantonio, *Bari*

12.55-13.10 **Questions and answers**

13.10-14.10 *Lunch*

III Session

Treatment of HBeAg negative CHB

Chairpersons: F. Piccinino, Napoli - A. Smedile, Torino

14.10-14.30 **Peg-IFN**
M.R. Brunetto, *Pisa*

14.30-14.50 **Nucleos(t)ide analogues**
A. Craxì, *Palermo*

14.50-15.05 **Questions and answers**

IV Session

Chairpersons: F. Bonino, *Milano* - A. Picciotto, *Genova*

15.05-15.25 **Treatment of compensated cirrhosis**
V. Di Marco, *Palermo*

15.25- 15.45 **Management of nucleos(t)ide-resistant patients**
M. Levrero, *Roma*

15.45-16.00 **Question and answers**

16.00-16.20 *Break*

V Session

HBV therapy in special populations

Chairpersons: M. Colombo, *Milano* - G. Pastore, *Bari*

16.20-16.35 **Decompensated liver disease and OLT**
M. Angelico, *Roma*

16.35-16.50 **Prophylaxis in onco-hematology**
A. Marzano, *Torino*

16.50-17.05 **HIV/HBV coinfected patients**
M. Puoti, *Brescia*

17.05-17.20 **Questions and answers**

VI Session

Chairpersons: G. Carosi, *Brescia* - M. Rizzetto, *Torino*

17.20- 17.40 **Beyond the Stresa's consensus: a look into 2008**
A. Alberti, *Padova*

17.40-18.00 **Questions and answers**

18.00-18.10 Conclusions

18.10-18.20 Check of Learning

18.20-19.00 **General Assembly I**

EPIDEMIOLOGY AND NATURAL HISTORY OF HEPATITIS B

Giovanna Fattovich, Michela Pasino
Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Gastroenterologiche, Università di Verona

EPIDEMIOLOGY

Approximately one third of the world's population has serological evidence of past or present infection with hepatitis B virus (HBV) and about 400 million people, particularly in developing countries, are chronically infected. It is estimated that worldwide over 200000 and 300000 chronic HBV carriers die each year from cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC), respectively (1,2).

Three different patterns of hepatitis B endemicity (high, intermediate and low) with well-defined geographic distribution have been recognized (3). The prevalence of HBV infection is especially high in South-East Asia, Sub-Saharan Africa and the Western Pacific where more than 8% of the population are chronic hepatitis B surface antigen (HBsAg) carriers. In areas with this pattern perinatal transmission or transmission during early childhood are responsible for the high rate of chronic HBV infection. In most developed parts of the world the prevalence of chronic HBV infection is less than 1%. Within these areas of low hepatitis B endemicity most infections occur among high risk adult populations that include injection drug users, persons with multiple heterosexual partners, men who have sex with men, and healthcare workers.

In recent years , the improvement of social conditions, observation of universal precaution measures in the health care setting and implementation of mass vaccination of children or adolescents has lead to a reduced incidence of acute hepatitis B particularly at young ages and to a slow but steady declining prevalence of chronic HBV infection in the general population in western countries. A significant decline of the incidence of acute hepatitis B has been documented in Italy, from 12 of 100.000 inhabitants in 1985 to 1.3 of 100.000 inhabitants in 2005 (4). Between the 1960s and the 1970s Italy was considered a country at intermediate (2%-7%) to high level of hepatitis B endemicity, but several recent surveys have shown that at present the HBsAg prevalence in the general Italian population is largely below 2% (5,6). As a consequence of the reduction over time of HBV endemicity , in 2001 a study performed in 79 Italian hospitals has reported that among 10.000 subjects affected by chronic liver disease only 10% were HBsAg positive (7). However HBV infection in Italy still remains an important health problem associated with unsafe sex, intravenous drug use or uncontrolled medical procedures in adults who are not yet covered by universal immunization programs. Importantly the high HBV carrier rate observed among immigrants from sub-Saharan Africa, Asia and Eastern Europe could increase the future burden of chronic hepatitis B in our area (8). Approximately 5% of children adopted from Asia, Russia and Eastern Europe have chronic hepatitis B. Vaccination programs have still not been implemented in all countries, thereby maintaining reservoirs of infection and continued HBV transmission.

Available data indicate a trend of increasing prevalence of HBeAg negative chronic hepatitis worldwide, probably reflecting the aging of existing HBsAg carriers (9). Recent studies have reported that approximately 90% of unselected adult chronic HBV carriers from Italy are HBeAg negative and anti-HBe positive at diagnosis (10).

Recent data indicate that the prevalence of chronic hepatitis Delta virus (HDV) has not changed in the last decade in Italy. In 2006, a survey in 21 Italian centers found that the prevalence of anti-HDV antibodies was 8.1% among 1179 consecutive HBsAg positive patients, similar to the 8.3% prevalence reported in 1997 (11).

NATURAL HISTORY

The likelihood of developing chronic HBV infection is higher in individuals infected perinatally (90%) or during childhood (20-30%), when the immune system is thought to be immature, compared with immunocompetent subjects infected during adulthood (< 1%). The phases of chronic HBV infection described herein refer to patients infected early in life. The natural course of chronic HBV infection can be divided into four phases based on the virus-host interaction: immune tolerance, immune clearance, low or non-replication, and reactivation (1, 12).

The initial immunotolerant phase is characterized by the presence of hepatitis B e antigen (HBeAg), very high serum levels of HBV-DNA, but normal or minimally elevated serum alanine aminotransferase (ALT) and normal liver or only minimal histological activity. Most Asian children, in whom chronic HBV infection is usually perinatally acquired, present in the immunotolerant phase with "HBeAg positive chronic hepatitis with normal ALT".

After a variable period of HBeAg positivity, depending on the age at acquisition of HBV infection, immune tolerance to the virus is lost and the immune system mounts an attack on infected hepatocytes. This second immunoactive phase is characterized by fluctuating, but progressively decreasing HBV-DNA levels, elevated ALT and hepatic necroinflammation. Patients with late childhood, adolescence or adult-acquired chronic HBV infection usually present in the immunoactive phase with HBeAg positive chronic hepatitis with elevated serum ALT and moderate or severe necroinflammation with variable amounts of fibrosis on liver biopsy. Serum HBV-DNA levels generally exceed 20000 IU/ml among patients with HBeAg positive chronic hepatitis.

An important outcome of the immunoactive phase is seroconversion from HBeAg to anti-HBe, marking the transition to the third low or non replication phase (inactive HBsAg carrier state) which is characterized by HBeAg negativity and anti-HBe positivity, undetectable or low levels of HBV-DNA (suggested levels less than 2000 IU/ml), persistently normal ALT levels and inactive liver histology with a usually minimal amount of fibrosis. HBeAg seroconversion occurs at an annual rate of 10% to 15% in adults with elevated ALT (13). Long term studies of HBeAg positive chronic hepatitis in adults show that most become inactive carriers after spontaneous HBeAg seroconversion (14,15). Most carries remains in the inactive phase for life. However, as viral supercoiled DNA persists in the liver, a number of inactive HBsAg carriers may eventually develop HBV reactivation with recrudescence of liver disease either spontaneously or triggered by active immunosuppression. Reactivation of viral replication may occur due to reactivation with the wild type virus with reversion back to the HBeAg positive state, or much more frequently with replication-competent HBV variants that prevent HBeAg expression.

The fourth reactivation phase is characterized by HBeAg negativity with anti-HBe positivity, detectable serum HBV-DNA levels (2000 to 20 million IU/ml), ALT elevation and moderate or severe necroinflammation with variable amounts of fibrosis on liver biopsy (HBeAg negative chronic hepatitis) (9). Progression to HBeAg negative chronic hepatitis occurs at a rate of 1 to 3 per 100 person years following HBeAg seroconversion (14-16). Many patients with HBeAg negative chronic hepatitis have wide fluctuations in both HBV-DNA and serum ALT levels (17). Spontaneous sustained remissions of disease activity are rare.

During the inactive carrier state spontaneous HBsAg loss may occur at a rate of 1%-2% per year in white carriers and 0.05-0.8% in Chinese carriers (12, 13). Longitudinal studies have demonstrated that HBsAg seroclearance confers excellent long-term prognosis, except in patients with cirrhosis or those with concurrent hepatitis C virus (HCV) or HDV infection before HBsAg clearance (18). Indeed HCC development is still possible, particularly in patients with cirrhosis who had HBsAg seroclearance at an older age
.

Based on a knowledge of the natural history of chronic HBV infection, patients can be classified according to their serologic status as shown in Table 1.

1. Complications of chronic hepatitis B

A recent review of available data on the natural history of chronic hepatitis B has estimated summary measures of the incidence rates of cirrhosis, HCC, decompensation and liver-related mortality in subjects with chronic HBV infection (18).

Incidence of cirrhosis

In patients with HBeAg positive chronic hepatitis, the summary cirrhosis incidence rates were 1.6 and 3.8 per 100 person years in East Asian countries and European countries, respectively; the corresponding 5-year cumulative incidences of cirrhosis were 8% and 17%. A detailed analysis of the studies from East Asia showed the lowest incidence of cirrhosis (0.5 per 100 person years) in a study of HBeAg positive patients (mean age 27 yrs) with normal ALT (immunotolerant phase) (16). Thus, the lower overall incidence rates of cirrhosis in Asian compared to Western studies, may be due to the inclusion in the former of a substantial proportion of HBeAg positive carriers presenting in the early immune tolerance phase of chronic HBV infection.

The progression to cirrhosis appears to be faster in HBeAg negative chronic hepatitis. In patients with HBeAg negative chronic hepatitis, the summary cirrhosis incidence rates were 2.8 and 9.7 per 100 person years in East Asian and European countries, respectively; the corresponding 5-year cumulative incidences of cirrhosis were 13% and 38%.

Incidence of hepatocellular carcinoma

In studies conducted in East Asian countries, the summary HCC incidence rate ranged from 0.2 per 100 person years among inactive carriers to 0.6 in persons with chronic hepatitis B but without cirrhosis and 3.7 in subjects with compensated cirrhosis; the corresponding 5-year HCC cumulative incidences were 1%, 3% and 17%. In studies performed in Europe and the United States, the summary HCC incidence rate was 0.02 per 100 person years in inactive carriers, 0.3 in subjects with chronic hepatitis B without cirrhosis, and 2.2 in subjects with compensated cirrhosis; the corresponding 5-year HCC cumulative incidences were 0.1%, 1% and 10%.

Incidence of hepatic decompensation

The incidence of hepatic decompensation and/or gastroesophageal varices bleeding was 3-4 per 100 person years in patients with early stages of cirrhosis in both European and Asian studies, with a 5-year cumulative incidence of liver decompensation of 15% .

Liver-related mortality rates

In patients with chronic HBV infection, the mortality rate differs according to the study population. Liver related mortality appears to be rare in inactive carriers (14,15,19). The summary liver related death rate was 0.03 per 100 person years among inactive HBsAg carriers and < 0.1 in persons with chronic hepatitis without cirrhosis (18).

In patients with compensated cirrhosis B, the summary liver-related death rates were 3.3 and 2.9 per 100 person years in Europe and East Asia, respectively, and the 5-year liver-related death rate was 15% in Europe e 14% in East Asia. Once hepatic decompensation occurs, mortality rate increases remarkably ranging from 70% to 85% at 5-year follow-up in different studies (13).

2. Factors predicting disease progression

Factors influencing progression to cirrhosis and HCC in patients with chronic hepatitis B are shown in tables 2 and 3. High levels of HBV-DNA replication and disease activity at enrolment and during follow-up are the best predictors of adverse clinical outcomes (cirrhosis, HCC, decompensation and liver

related mortality) (14-16,20-22). Sustained reduction of HBV replication before the onset of cirrhosis confers a favourable prognosis, with similar survival compared to uninfected individuals (14,15,19). Sustained reduction of viral replication in cirrhotic patients lowers the risk of HCC and improves survival (13). There is increasing evidence that HBV genotype may have a role in determining different clinical outcome (18). Older age, male gender, multiple ALT flares, severity of fibrosis stage at presentation, severity of compensated cirrhosis at presentation, concurrent infections (HBV/HCV and/or HBV/HDV) and alcohol abuse are additional predictors of disease progression (16,20,21,23-27). Further studies are needed to clarify the interplay of each known viral factor (HBV genotypes (subgenotypes, genotype mixtures), mutants and viral load) and to investigate other viral factors (HIV coinfection during the HAART era) and preventable or treatable comorbidities (obesity, diabetes) in the prognosis of chronic hepatitis B (27-31).

CONCLUSIONS

The following conclusions can be drawn: 1. At present Italy is a country with a low endemic level of HBV infection. Multiple sexual partners, drug addiction and uncontrolled medical procedures are the most common sources of HBV infection in individuals not immunised against hepatitis B. HBV is the etiologic factor of approximately 10% of chronic liver disease in Italy. HBeAg negative chronic hepatitis is most common among patients with chronic hepatitis B. Increasing immigration from high HBV endemic area could increase the future burden of chronic hepatitis B in our area. 2. Chronic hepatitis B is characterized by an early replicative phase (HBeAg positive chronic hepatitis) and a late low or nonreplication phase with HBeAg seroconversion and liver disease remission (inactive carrier state). Most patients become inactive carriers after spontaneous HBeAg seroconversion with good prognosis, but progression to HBeAg negative chronic hepatitis due to HBV variants not expressing HBeAg occurs at a rate of 1-3 per 100 person years following HBeAg seroconversion. 3. The incidence of cirrhosis appears to be about 2-fold higher in HBeAg negative compared to HBeAg positive chronic hepatitis. The HCC incidence rate varies substantially according to geographic area and the underlying stage of liver disease at diagnosis. The risk of HCC is higher in persons with HBV infection from Asia than from Western countries, possibly because of earlier acquisition of the virus infection, longer duration of disease. and/or exposure to environmental factors. The risk of acquiring HCC is higher in patients with, than those without, cirrhosis in both Eastern and Western studies. 4. There is a growing understanding of viral, host and environmental factors influencing disease progression, which ultimately could improve the management of chronic hepatitis B (tables 2 and 3). 5. Differences in long term outcomes between patients infected perinatally or early in life and those infected during adulthood should be taken into account in current recommendation for treatment of chronic hepatitis B.

REFERENCES

1. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. Consensus statement. J Hepatol 2003; 38: 533-540.
2. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contribution of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. J Hepatol 2006; 45: 529-538.
3. Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL, Kowdley KV. Global epidemiology of hepatitis B virus. J Clin Gastroenterol 2004; 38: S158-S168.
4. http://www.iss.it/seie
5. Da Villa G, Romanò L, Sepe A, Iorio R, Paribello N, Zappa A, et al. Imapct of hepatitis B vaccination in a higly endemic area of south Italy and long-term duration of anti-HBs antibody in two cohorts of vaccinated individuals. Vaccine 2007; 25: 3133-3136
6. Stroffolini T, Gaeta GB, Mele A. AASLD practice guidelines on chronic hepatitis B and HBV infection in Italy. Hepatology 2007; 46: 608-609.
7. Sagnelli E, Stroffolini T, Almasio P, Mele A. The relevance of hepatitis C virus infection in the burden of chronic liver disease in Italy. J Med Virol 2005; 75: 522-527.
8. Scotto G, Saracino A, Pempinello R, El Hamad I, Geraci S, Palumbo E, et al. Epidemiological multicentric study on prevalence of hepatitis in hospitalised immigrants in Italy during 2002. Ann Ig 2005; 17: 11-18.
9. Hadziyannis S, Papatheodoridis GV. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis: natural history and treatment. Semin Liver Dis 2006; 26: 130-141.
10. Gaeta GB, Stornaiuolo G, Precone DF, Lobello S, Chiaramonte M, Stroffolini T, et al. Epidemiological and clinical burden of chronic hepatitis B virus/hepatitis C virus infection. A multicenter Italian study. J Hepatol 2003; 39: 1036-1041.
11. Gaeta GB, Stroffolini T, Smedile A, Niro G, Mele A. Hepatitis Delta in Europe: Vanishing or refreshing ? Hepatology 2007; 46: 1312-1313
12. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B. Hepatology 2007; 45: 507-539.
13. Fattovich . Natural history and prognosis of hepatitis B. Semin Liver Dis 2003; 23: 47-68.
14. Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, et al. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. Hepatology 2002; 35: 1522-1527.
15. Fattovich G, Olivari N, Pasino M, D'Onofrio M, Martone E, Donato F. Long-term outcome of chronic hepatitis B in Caucasian patients: mortality after 25 years. Gut 2008; 57: 84-90.
16. Chu CM, Hung SJ, Lin J, Tai DI, Liaw YF. Natural history of hepatitis B e antigen to antibody seroconversion in patients with normal serum aminotransferase levels. Am J Med 2004; 116: 829-834.
17. Brunetto MR, Oliveri F, Coco B, Leandro G, Colombatto P, Gorin JM, et al. Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. J Hepatol 2002; 36: 263-270.
18. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. J Hepatol 2008; 48: 335-352.
19. Manno M, Cammà C, Schepis F, Bassi F, Gelmini R, Giannini F, et al. Natural history of chronic HBV carriers in Northern Italy: morbidity and mortality after 30 years. Gastroenterology 2004; 127: 756-763.
20. Iloeje UH, Yang HI, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. Gastroenterology 2006; 130: 678-686.
21. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. JAMA 2006; 295: 65-73.
22. Chen G, Lin W, Shen F, Iloeje UH, London WT, Evans AA. Past HBV load as predictor of mortality and morbidity from HCC and chronic liver disease in a prospective study. Am J Gastroenterol 2006; 101: 1-7.
23. Park BK, Park YN, Ahn SH, Lee KS, Chon CY, Moon YM, et al. Long-term outcome of chronic hepatitis B based on histological grade and stage. J Gastroenterol Hepatol. 2007;22:383-388.
24. Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Koida I, et al. Disease progression and hepatocellular carcinogenensis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation in 2215 patients. J Hepatol 1998; 28: 930-938.
25. Fattovich G, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW, Christensen E. Effect of hepatitis B and C virus infections on the natural history of compensated cirrhosis: a cohort study of 297 patients. Am J Gastroenterol 2002; 97: 2886-2895.
26. Liaw YF, Chen YC, Sheen IS, Chien RN, Yeh CT, Chu CM. Impact of acute hepatitis C virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection. Gastroenterology 2004; 126: 1024-1029.

27. Donato F, Gelatti U, Limina RM, Fattovich G. Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: a systematic review of the epidemiologic evidence. Oncogene 2006: 25: 3756-3770.
28. Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. High prevalence and mapping of pre-S detetion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. Gastroenterology 2006; 130: 1153-1168.
29. Puoti M, Torti C, Bruno R, Filice G, Carosi G. Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients. J Hepatol 2006; 44: S65-S70.
30. Bondini S, Kallman J, Wheeler A, Prakash S, Gramlich T, Jondle DM, et al. Impact of non-alcolic fatty liver disease on chronic hepatitis B. Liver Int 2007;27: 607-611.
31. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. Gut 2005; 54: 533-539.

Table 1. Serological profiles of chronic hepatitis B virus infection with respect to viral load and ALT levels

Phase	Serum ALT	HBeAg	Anti-HBe	HBV-DNA (IU/ml)	
Immune tolerance	Normal or minimally elevated	Positive	Negative	Very high levels	20 million to 20 billion
HBeAg positive chronic hepatitis	Persistently elevated	Positive	Negative	High levels	200,000 to 2 billion
HBeAg negative chronic hepatitis	Elevated and often fluctuating	Negative	Positive	Moderate levels, often fluctuating	2,000 to 20 million
Inactive carrier	Normal	Negative	Positive	Low or no detectable levels	< 2,000

Table 2. Factors associated with increased risk of progression to cirrhosis

Factors	**Comment**
Host related	
- older age	Important
- male gender	Important
- severity of fibrosis stage at presentation (F3)	Important
- recurrent flares of hepatitis	Important
Viral related	
- High levels of HBV replication during follow-up	Important
- HBV genotype (C > B; D > A)	Increasing evidence
- HBV variant (core promoter; pre-S)	Increasing evidence
- HDV concurrent infection	Important
- HCV concurrent infection	Important
- HIV concurrent infection	Important [a]
Other factors	
- heavy alcohol consumption	Important
- steatosis	More research needed
- diabetes	More research needed
- obesity	More research needed

[a] Studies conducted before the introduction of highly active antiretroviral therapy

Table 3. Factors associated with increased risk of HCC occurrence

Factors	**Comment**
Host related	
- older age	Important
- male gender	Important
- presence of cirrhosis	Important
- family history of HCC	Important
- race (Asian, African)	Important
Viral related	
- High levels of HBV replication during follow-up	Important
- HBV genotype (C > B)	Increasing evidence
- HBV variant (core promoter ; pre-S)	Increasing evidence
- HDV concurrent infection	Important
- HCV concurrent infection	Important
- HIV concurrent infection	More research needed
Other factors	
- heavy alcohol consumption	Important
- aflatoxin	Important in HBV endemic regions
- smoking	More research needed
- diabetes	More research needed
- obesity	More research needed

RISPOSTA IMMUNITARIA E PATOGENESI DELL'INFEZIONE DA HBV: IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE

Carlo Ferrari
Unità Operativa di Malattie Infettive ed Epatologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

HBV è un virus non direttamente citopatico per le cellule infettate, che può causare danno epatico acuto o cronico tramite l'attivazione delle risposte immunitarie proteggenti, che nell'intento di eliminare le cellule infettate causano anche malattia (1). La tendenza a cronicizzare diminuisce con l'aumentare dell'età del paziente: è massima nell'età neonatale (90%), si riduce al 25-30% nei casi acquisiti prima dell'età di 5 anni, mentre l'infezione tende ad essere auto-limitata nel 90-95% dei casi acquisiti nell'età adulta (2).

Cinetica di replicazione di HBV e risposte immunitarie precoci. Dopo l'infezione, HBV tende a rimanere in una condizione di quiescenza per alcune settimane, con bassi livelli di HBV-DNA in circolo (10^2-10^4 copie/ml di virus), prima di iniziare una replicazione attiva che determina un rapido innalzamento della viremia (10^9-10^{10} copie/ml di virus) e l'infezione di gran parte degli epatociti (3-10). I dati disponibili indicano che nelle infezioni auto-limitate più del 90% dell'HBV-DNA viene eliminato entro 2-3 settimane dal momento del picco massimo di replicazione virale, prima della massima attivazione delle risposte CD8-mediate e del picco di transaminasi (8). Quindi una notevole quantità di virus viene eliminato dall'organismo senza la necessità di distruzione delle cellule infettate, presumibilmente grazie ad un effetto anti-virale non citolitico sostenuto da citochine, quali IFN-α e β e TNF-α, rilasciate prevalentemente dai linfociti T. Infatti, studi eseguiti nel modello di infezione dello scimpanzé con la tecnica dei microarrays mostrano che i geni che codificano per le principali componenti dell'immunità innata non si attivano efficientemente nelle fasi iniziali dell'infezione all'interno del fegato degli animali infettati (12), come se l'immunità innata non riuscisse a "sentire" la presenza di HBV. Questa apparente attivazione inefficiente dell'immunità innata contrasta con dati recenti ottenuti in pazienti con infezione acuta da HBV che documentano un precoce aumento di frequenza e una precoce attivazione di cellule NK e NKT (dati personali non pubblicati). Inoltre, una inefficiente attivazione dell'immunità innata risulta difficile da riconciliare con la tempestiva attivazione delle risposte T linfocitarie CD4- e CD8-mediate HBV-specifiche che, in caso di epatite acuta a risoluzione spontanea, si realizza subito dopo l'incremento rapido della viremia (6,13).

Risposte immunitarie adattative in fase acuta di infezione in relazione all'esito dell'epatite. Nelle epatiti acute autolimitate le risposte cellulo-mediate HBV-specifiche sono tipicamente multispecifiche, orientate in senso Th1 e significativamente più intense delle risposte misurabili nell'infezione cronica (14-23). Lo sviluppo coordinato delle risposte CD4- e CD8-mediate risulta essenziale per il controllo efficace dell'infezione, anche se esperimenti di deplezione linfocitaria condotti nel modello dello scimpanzé sottolineano il ruolo proteggente fondamentale svolto dai linfociti CD8 (13). Infatti, la deplezione di questa sottopolazione T linfocitaria compromette il controllo dell'infezione, con netto prolungamento del periodo di viremia e di innalzamento delle transaminasi. Il controllo dell'infezione non può comunque prescindere dalla risposta umorale e dagli anticorpi neutralizzanti anti-envelope, la cui produzione è strettamente dipendente dall'effetto helper dei linfociti CD4 (1). Gli anticorpi anti-envelope risultano fondamentali per neutralizzare le particelle virali libere circolanti e per bloccare l'infezione di nuove cellule (24,25).

Ben poco si sa invece sul comportamento delle risposte immunitarie adattative nella fase acuta dell'infezione che successivamente progredisce verso la cronicità. E' stato suggerito che le risposte T linfocitarie HBV-specifiche siano già deficitarie in fase acuta di infezione negli individui che non riescono ad eliminare il virus spontaneamente (26), come anche confermato da studi compiuti nel modello di infezione del woodchuck (27-31)

Risposta immunitaria adattativa in corso di infezione cronica. E' noto che una volta che l'infezione si è cronicizzata, le risposte immunitarie HBV-specifiche vanno incontro ad una compromissione funzionale sempre più profonda (32-34). Nei pazienti con danno epatico cronico, le risposte CD4- e CD8-mediate sono generalmente deboli o del tutto assenti nel sangue circolante, con un repertorio linfocitario focalizzato su epitopi solitamente subdominanti (35). La soppressione di tale risposta è più profonda nei pazienti altamente viremici (35) e contrastanti sono le informazioni riguardanti la possibilità di un ripristino spontaneo delle risposte T linfocitarie virus-specifiche, in particolare in concomitanza delle fasi di riattivazione della malattia (35,36), che possono essere precedute da un recupero della reattività dei linfociti CD4 nei confronti degli antigeni nucleocapsidici (37,38). Tali *flares* epatitici si associano inoltre ad un incremento delle risposte NK-mediate che potrebbero quindi giocare un ruolo rilevante nella loro patogenesi (39).
I linfociti HBV-specifici tendono comunque ad essere sequestrati nella fase cronica dell'infezione all'interno del fegato, dove tuttavia risultano fortemente diluiti all'interno di un'enorme popolazione linfocitaria aspecifica, attratta all'interno del fegato dall'infiammazione (40). Sorprendentemente, la frequenza dei linfociti T HBV-specifici è più elevata nel fegato dei pazienti portatori inattivi di virus, con transaminasi persistentemente normali (40). In questi pazienti la funzione linfocitaria appare meglio preservata, suggerendo che la condizione di portatore cronico inattivo e asintomatico di HBV si associ ad una elevata capacità della risposta immunitaria di tenere sotto controllo l'infezione, piuttosto che ad una situazione di tolleranza immunitaria nei confronti delle proteine virali, come in passato si era ritenuto.

Meccanismi di persistenza di HBV nell'organismo infettato e implicazioni terapeutiche. Se la depressione delle risposte T linfocitarie tipica dei pazienti con epatite cronica da HBV sia una causa o una conseguenza della persistenza virale rimane tuttora un quesito aperto. Certamente, tuttavia, la depressione funzionale linfocitaria può contribuire a mantenere la persistenza del virus, una volta che questa si è instaurata. Una delle sue principali cause è da identificarsi nella prolungata esposizione dei linfociti ad alte quantità di virus e di antigene, costantemente presenti in corso di infezione cronica, che può determinare esaurimento funzionale dei linfociti (41). HBV è infatti capace di produrre altissime quantità di particelle virali non-infettanti, costituite da antigene dell'envelope, e di secernere HBeAg, che rappresenta una forma secretoria, non strutturale di antigene nucleocapsidico. Esaurimento da delezione o da inibizione funzionale è pertanto ritenuto essere il destino dei linfociti HBsAg- e HBeAg-specifici stimolati cronicamente da alte quantità di tali antigeni. L'importanza dell'esaurimento quale causa di disfunzione T linfocitaria è confermata dall'elevata espressione di PD-1 sui linfociti CD8 HBV-specifici nell'epatite cronica B (36). Studi in modelli animali (42) hanno infatti dimostrato che l'interazione di PD-1 con il suo ligando PD-L1, che può essere espresso anche sugli epatociti in corso di infezione (43), può condurre a inattivazione funzionale linfocitaria, fino alla possibile delezione fisica dei linfociti stessi in caso di esposizione prolungata a concentrazioni particolarmente elevate di antigene. Inoltre, è stato anche dimostrato che bloccando in vitro l'interazione fra PD-1 e PD-L1 utilizzando anticorpi anti-PD-L1 è possibile ripristinare la funzione linfocitaria anti-virale (36). D'altronde il ruolo patogenetico dell'esauri-

mento funzionale da alte dosi di antigene è anche suggerito dalla più profonda inibizione funzionale linfocitaria nelle fasi di infezione con più elevata viremia (35,36) e dalla possibilità di ripristinare, sia pure parzialmente e transitoriamente, la funzione linfocitaria inibendo la replicazione virale tramite terapia con analoghi nucleosidici (44-46).

Se il ripristino di una efficiente capacità anti-virale linfocitaria può contribuire al controllo dell'infezione e una delle principali cause di disfunzione linfocitaria è l'esaurimento da alte concentrazioni di antigene, ne consegue che una razionale strategia terapeutica per le infezioni croniche da HBV possa essere rappresentata da un ripristino della responsività linfocitaria, tramite inibizione della replicazione di HBV e blocco dell'interazione PD-1/PD-L1, seguita da una stimolazione mirata dei linfociti T HBV-specifici funzionalmente ripristinati, con vaccini capaci di stimolare sia le risposte CD4- che le risposte CD8-mediate.

BIBLIOGRAFIA

1. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nat Rev Immunol. 2005;5:215-29
2. Lok A, and McMahon BJ. Chronic hepatitis B. Hepatology 2001; 34:1225-41.
3. Berquist KR, Peterson J., Murphy BL, et al.Hepatitis B antigens in serum and liver of chimpanzees acutely infected with hepatitis B virus. Infect. Imm. 1975;12:602-5.
4. Fong TL, Di Bisceglie AM, Biswas R, et al. High levels of viral replication during acute hepatitis B infection predict progression to chronicity. J. Med. Virol. 1994; 43:155-8.
5. Korba BE, Cote PJ, Wells FV, et al. Natural history of woodchuck hepatitis virus infections during the course of experimental viral infection: molecular virologic features of the liver and lymphoid tissues. J Virol 1989; 63:1360-70.
6. Webster G, Reignat S, Maini M, et al. Incubation phase of acute Hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanism. Hepatology 2000; 32:1117-24.
7. Whalley SA, Murray JM, Brown D, et al. Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. J Exp Med 2001;193:847-54.
8. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. Science 1999; 284:825-829.
9. Jilbert A, Wu T, England J, et al. Rapid resolution of duck hepatitis B virus infections occurs after massive hepatocellular involvement. J. Virol. 1992; 66:1377-88.
10. Kajino K, Jilbert AR, Saputelli J, et al. Woodchuck hepatitis virus infections: very rapid recovery after prolonged viremia and infection of virtually every hepatocyte. J. Virol. 1994; 68:5792-5803.
11. McClary H, Koch R, Chisari FV, et al. Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. J Virol. 2000;74:2255-64.
12. Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection.Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:6669-74.
13. Thimme R, Wieland S, Steiger C, et al. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection.J Virol. 2003;77:68-76.
14. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, et al. Cellular immune response to hepatitis B virus encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. J. Immunol. 1990;145:3442-3449.
15. Jung M, Hartmann B, Gerlach J, et al. Virus-specifi lymphokine production differs quantitatively but not qualitatively in acute and chronic hepatitis B infection. Virology 1999; 261:165-72.
16. Jung M, Spengler U, Schraut W, et al. Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. J. Hepatol. 1991;13:310-317.
17. Penna A, Artini M, Cavalli A, et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. J. Clin. Invest 1996; 98:1185-94
18. Penna A, Chisari FV, Bertoletti A, et al. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. J. Exp. Med. 1991; 174:1565-1570
19. Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, et al. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. Nat. Med. 1996; 2:1104-1108.
20. Rehermann B, Fowler P, Sidney J, et al. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. J. Exp. Med. 1995; 181:1047-1058.
21. Penna A, Del Prete G, Cavalli A, et al. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B. Hepatology 1997; 25:1022-7 .
22. Maini MK, Boni C, Ogg GS, et al. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8+ T cells associated with the control of infection. Gastroenterology 1999;117:1386-96.
23. Urbani S, Boni C, Missale G, et al.Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. J Virol 2002;76:12423-34.
24. Alberti A, Diana S, Sculard Ghet al. Detection of a new antibody system reacting with Dane particles in hepatitis B virus infection. Br Med J 1978;2:1056-1058.
25. Grady GF, Lee VA, Prince AM, et al. Hepatitis B immune globulin for accidental exposures among medical personnel: final report of a multicenter controlled trial. J Infect Dis 1978;138:625-638.
26. Urbani S, Boni C, Amadei B, et al. Acute phase HBV-specific T cell responses associated with HBV persistence after HBV/HCV coinfection. Hepatology. 2005;41:826-31.

27. Roggendorf M, Tolle TK. The woodchuck: an animal model for hepatitis B virus infection in man. Intervirology 1995; 38:100-12.
28. Nakamura I, Nupp JT, Cowlen M, et al. Pathogenesis of experimental neonatal woodchuck hepatitis virus infection: chronicity as an outcome of infection is associated with a diminished acute hepatitis that is temporally deficient for the expression of interferon gamma and tumor necrosis factor-alpha messenger RNAs. Hepatology 2001; 33:439-47.
29. Cote P., Toshkov I, Bellezza C, et al. Temporal pathogenesis of experimental neonatal woodchuck hepatitis virus infection: increased initial viral load and decreased severity of acute hepatitis during the development of chronic viral infection. Hepatology 2000; 32:807-17
30. Menne S, Roneker CA, Roggendorf M, et al. Deficiencies in the acute-phase cell-mediated immune response to viral antigens are associated with development of chronic woodchuck hepatitis virus infection following neonatal inoculation. J Virol 2002; 76:1769-80.
31. Wang Y, Menne S, Jacob JR, et al. Role of type 1 versus type 2 immune responses in liver during the onset of chronic woodchuck hepatitis virus infection. Hepatology 2003; 37:771-80.
32. Bertoletti A., Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. Hepatology. 2003;38:4-13
33. Missale G, Cariani E, Ferrari C. Role of viral and host factors in HCV persistence: which lesson for therapeutic and preventive strategies? Dig Liver Dis. 2004;36:703-11
34. Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. J Virol. 2005;79:9369-80.
35. Webster GJ, Reignat S, Brown D, et al.Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. J Virol. 2004;78:5707-19.
36. Boni C, Boni C, Fisicaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertoletti A, Ferrari C. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. J Virol. 2007;81:4215-25.
37. Rossol S, Marinos G, Carucci P, et al. Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. J. Clin. Invest 1997;99:3025-33.
38. Tsai S, Chen M, Yang P. Acute exacerbation of chronic type B hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and e antigens. Implications for hepatitis B e antigen seroconversion. J. Clin. Invest. 1992; 98:1185-1194.
39. Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, Christophides T, Kennedy PT, Lampertico P, Das A, Lopes AR, Borrow P, Williams K, Humphreys E, Afford S, Adams DH, Bertoletti A, Maini MK. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. J Exp Med. 2007; 19;204:667-8.
40. Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. The role of virus-specific CD8+ cells in viral control and liver damage during persistent hepatitis B virus (HBV) infection. J.Exp. Med. 2000;191:1269-1280.
41. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. J Virol 2003; 77:4911-27.
42. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature 2006; 439 :682-7.
43. Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, Weiss T, Froh M, Blank C et al. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. J Hepatol. 2006; 45:520-8.
44. Boni C, Bertoletti A, Penna A, Cavalli A, Pilli M, Urbani S, Scognamiglio P, Boehme R, Panebianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B. J Clin Invest. 1998;102:968-75.
45. Boni C, Penna A, Ogg GS, Bertoletti A, Pilli M, Cavallo C, Cavalli A, Urbani S, Boehme R, Panebianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. Hepatology. 2001;33:963-71
46. Boni C, Penna A, Bertoletti A, Lamonaca V, Rapti I, Missale G, Pilli M, Urbani S, Cavalli A, Cerioni S, Panebianco R, Jenkins J, Ferrari C. Transient restoration of anti-viral T cell responses induced by lamivudine therapy in chronic hepatitis B. J Hepatol. 2003;39:595-605.

RESISTENZA DELL'HBV AGLI ANTIVIRALI SPECIFICI: DEFINIZIONE, BASI MOLECOLARI, TESTS DIAGNOSTICI

G. Raimondo

Resistenza primaria al trattamento con antivirali (o ***non-risposta primaria***) è l'incapacità di un analogo nucleos(t)idico a ridurre la concentrazione ematica di HBV DNA di un valore ≥ 1 $\log_{10}$ entro sei mesi di terapia. Detta ***resistenza primaria*** può essere ascritta a (1) fattori relati all'ospite (incapacità di convertire il pro-farmaco nel composto attivo), (2) pre-esistenza al trattamento di varianti virali resistenti al farmaco, (3) bassa potenza (o basso dosaggio) del farmaco.
Resistenza secondaria al trattamento con antivirali (o ***breakthrough virologico***) l'incremento ≥ 1 $\log_{10}$ dei livelli ematici di HBV DNA rispetto al nadir in due controlli consecutivi eseguiti a distanza di un mese in pazienti che avevano inizialmente risposto e per i quali non vi è dubbio di una buona *compliance*.
Breakthrough biochimico è l'incremento dei livelli delle ALT durante il trattamento in pazienti che ne avevano ottenuto la normalizzazione nelle prime fasi della terapia.
Resistenza genotipica agli antivirali è la presenza di una mutazione nucleotidica *missense* (cioè responsabile di una sostituzione aminoacidica) nel gene *target* del farmaco che, nel caso degli antivirali HBV specifici oggi disponibili, è rappresentata dalla regione della trascrittasi inversa (RT). La conferma della capacità di una mutazione di conferire resistenza genotipica si può ottenere (1) attraverso la valutazione *in vitro* della ***resistenza fenotipica*** oppure (2) attraverso l'analisi *fenotipica virtuale* che si avvale di un *database* in cui siano integrate ed analizzate statisticamente le informazioni sulla risposta al trattamento e sulla variabilità genetica dell'HBV ottenute da un ampio numero di pazienti trattati. La *resistenza fenotipica* è la dimostrazione, in vitro, della resistenza conferita dalla sostituzione di un amminoacidoe e quindi della ridotta risposta della polimerasi dell'HBV agli antivirali.
Mutazioni primarie sono quelle mutazioni che conferiscono una ridotta sensibilità da parte del virus nei confronti di un determinato antivirale. Dette mutazioni determinano, in genere, una ridotta capacità replicativa (*fitness replicativa*) del virus, ma la selezione di ***mutazioni secondarie compensatorie*** può ripristinare l'attività polimerasica ed in taluni casi può addirittura incrementare la *fittness replicativa* del virus.

L'HBV possiede un'alta capacità replicativa (può produrre sino a 10^{12} virioni al giorno) ed un elevato tasso mutazionale con circa 10^{-5} sostituzioni per base ad ogni ciclo replicativo. Ciò si traduce nell'introduzione di 10^{10-11} mutazioni puntiformi, al giorno, in HBV in fase di attiva replicazione. Inoltre, a tale rapido emergere di mutazioni contribuisce anche l'assenza della funzione *proofreading* della *RT* virale che la rende incapace di correggere le errate incorporazioni nucleotidiche. La probabilità che una mutazione venga ad essere selezionata durante la terapia antivirale dipende dalla capacità del farmaco di sopprimere la replicazione virale. Pertanto, teoricamente un farmaco con una minima attività antivirale non eserciterà alcuna sostanziale pressione selettiva sul virus e le possibilità di sviluppo di farmaco-resistenza saranno basse. Di contro, la completa soppressione della replicazione virale fornisce poche opportunità all'emergere di forme virali resistenti, poiché la mutagenesi è replicazione-dipendente. Un limite importante delle terapie oggi disponibili è la loro azione diretta contro lo stesso target virale, la RT, e ciò aumenta le probabilità della selezione di forme virali con resistenza crociata a più antivirali. Il regime terapeutico ideale vedrebbe, invece, l'utilizzo in combinazione di farmaci diretti contro diversi possibili siti target del virus, come accade nella terapia anti-HIV. Un aspetto importante da sottolineare è che gli analoghi nucleot(s)idici attualmente disponibili sono potenti inibitori della replicazione virale, ma non

sono in grado di eliminare i virus già presenti nell'organismo né modificano in alcun modo il cccDNA dell'HBV.

Numerosi sono gli approcci metodologici utilizzati per l'identificazione delle mutazioni genetiche che conferiscono resistenza agli antivirali anti-HBV. Tuttavia, quelli che hanno trovato sino ad ora una applicazione pratica sono:

- Sequenziamento diretto dei prodotti di PCR che, consentendo la valutazione dell'intera regione gnomica della RT (*in house direct sequencing*) o di gran parte di essa (kit commerciale *Trugene genotyping test*), permette l'identificazione di tutte le mutazioni primarie e secondarie coinvolte nella resistenza ai farmaci. Tuttavia, esso rappresenta il metodo meno sensibile per l'individuazione di popolazioni mutanti eventualmente presenti in quantità minoritarie (< 20%) nel pool di virus circolante.
- Il kit commerciale della Innogenetics "Riverse Hybrydization Assay LiPA DR" permette di individuare singoli *mismatches* nucleotidici. Tale metodica ha una sensibilità maggiore rispetto al sequenziamento diretto, potendo individuare le popolazioni virali mutati quando queste costituiscono anche solo il 5 % di quella totale (5). Tuttavia, questa metodica ha il limite di poter svelare solo un subset prestabilito di varianti virali.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Ghany M, Liang TJ. Drug target and molecular mechanism of drug resistance in chronic hepatitis B. Gastroenterology 2007; 132:1574-1585.
2. Locarnini S, Hatzakis A, Heathcote J, Keeffe EB, Liang TJ, Mutimer D, et al.Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. Antivir Ther 2004; 9:679-693
3. Locarnini S, Mason WS Cellular and virological mechanism of HBV drug resistance. J Hepatol 2006;44:422-431.
4. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, et al. Antiviral Drug-resistant HBV: Standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. Hepatology 2007; 46: 254-264.
5. Nafa S, Ahmed S, Tavan D, Pichoud C, Berby F, Stuyver L, et al. Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B. Hepatology 2000;32: 1078-1088.
6. Pawlotsky J-M. The concept of hepatitis B virus mutant escape. J Clin Virol 2005; Sup 1: S125-S129.
7. Pawlotsky J- M, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Liang T J, Locarnini S, Martin P, Richman D D, Zoulim F. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. Gastroenterology 2008; 134: 405-415
8. Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V Mutations affecting the relication capacity of the hepatitis B virus. J Vir Hepat, 2006; 13: 427-434
9. Valsamakis A Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. Cli Microbiol Rev, 2007; 20: 426-439.
10. Zoulim F Mechanisms of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. Antiviral research, 2004; 64: 1-15

TRATTAMENTO CON INTERFERONE DEL PAZIENTE CON EPATITE CRONICA B, HBEAG NEGATIVA

Maurizia Rossana Brunetto
UO Epatologia – Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana

Scopo della terapia antivirale

L'epatite cronica virale è nella maggior parte dei casi una malattia asintomatica e quindi la terapia antivirale ha la finalità eminentemente preventiva di impedirne l'evoluzione in malattia clinica severa e in grado di ridurre l'aspettativa di vita del paziente. Il trattamento ha quindi lo scopo di evitare la progressione dell'epatite cronica in cirrosi o, qualora quest'ultima sia già presente, di evitare lo sviluppo delle complicanze (epatocarcinoma e scompenso funzionale epatico).
Per raggiungere tali obiettivi è necessario spegnere il processo necro-infiammatorio attraverso il controllo della replicazione virale, che può essere ottenuto con 2 modalità:

1. Cambiare in modo duraturo, ma con un trattamento di durata limitata nel tempo, l'equilibrio fra virus e ospite e passare da un equilibrio patogenetico, proprio dell'epatite, ad un nuovo equilibrio, non più patogenetico, dove la risposta immune competente è in grado di mantenere sotto costante controllo la replicazione virale. In sostanza il trattamento dovrebbe indurre quegli eventi che si verificano spontaneamente nel soggetto che diventa portatore inattivo di HBV.
2. Inibire in modo continuativo la replicazione virale, grazie a farmaci in grado di agire selettivamente sul virus.

Interferone, meccanismi di azione. Gli Interferoni (IFN) sono citochine con effetti antivirali, anti-proliferativi e immunomodulanti. L'*attività antivirale* è mediata attraverso l'induzione di geni cellulari che attivano meccanismi "antivirali" a livello delle cellule bersaglio dell'infezione virale. Nell'attività antivirale degli Interferoni sono coinvolti 3 principali sistemi di proteine: Proteina Chinasi R (PKR), 2-5 oligosintetasi /RNAasi e le proteins Mx. Gli Interferoni interferiscono a vari livelli con il ciclo vitale del virus, inibendo l'entrata del virus nelle cellule, attivando le ribonucleasi che inibiscono la replicazione virale o bloccando la maturazione, l'assemblaggio e il rilascio dei virioni dalle cellule infette.
Inoltre, gli Interferoni sono modulatori dell' *attività del sistema immune* attraverso molti meccanismi: incrementando l'attività delle cellule NK, aumentando l'espressione delle molecole MHC di classe I sulla superficie delle cellule che stimola la citotossicità delle cellule CD8 T, intensificando la risposta Th1 e aumentando l'espressione delle molecole MHC di classe II sulle cellule che presentano l'antigene. Infine, gli Interferoni stimolano la proliferazione delle cellule B con un aumento dell'immunità umorale.
Oltre all'Interferone ricombinate alfa (2a e 2b), all'Interferone leucocitario, negli ultimi anni si è resa disponibile, anche per l'epatite cronica B, la formulazione pegilata, nella quale l'Interferone alfa è coniugato a molecole di *polietilene glicole (PEG)*. La pegilazione modifica sia la farmacocinetica che la farmacodinamica dell'Interferone prolungandone l'emivita e garantisce la persistenza nel tempo di livelli elevati del principio attivo, con conseguente possibilità di ridurre la frequenza di somministrazione del farmaco. Delle 2 forme di Interferoni pegilati (l' Interferone alfa 2b, legato ad una molecola lineare di 12kD PEG e l'Interferone 2a legato ad una molecola di PEG più grande (40 kD PEG ramificato) attualmente disponibili in Italia, solo l' interferone pegilato 2a è autorizzato per il trattamento dell'epatite cronica B.

Interferone, definizione della risposta. Il trattamento con interferone interviene sull'equilibrio fra i fattori (replicazione virale e risposta del sistema immune) che condizionano l'andamento dell'infezione e malattia da HBV e può favorire all'instaurarsi di uno stato, nel quale il sistema immune controlla efficacemente la replicazione virale.
Per la specifica modalità d'azione, i criteri di valutazione della risposta al trattamento con Interferone sono diversi da quelli utilizzati nel caso di trattamento con analoghi nucleos(t)idici.
Durante il trattamento l'efficacia dell'Interferone è dimostrata dalla riduzione dei livelli viremici, che in genere avviene in modo più graduale e lento rispetto a quella osservata in corso di trattamento con farmaci che agiscono direttamente sulla polimerasi virale.
Mancano al momento delle precise regole che guidino il trattamento in base alla risposta virologica: si consiglia però di sospendere il trattamento in coloro che non abbiamo dimostrato caduta della viremia o che comunque mantengano livelli di HBV-DNA > 200.000 IU/mL dopo 24 settimane di trattamento.
Per ciò che concerne la risposta dopo la sospensione della terapia, il mantenimento di livelli viremici persistentemente al di sotto di 2000 IU/ml, in associazione con livelli di IgM anti-HBc < 0.2 Imx Index e transaminasi nella norma configura il raggiungimento di quell'efficace controllo della replicazione, che associa con lo spegnimento della malattia epatica. La perdita dell'HBsAg (un evento che si può verificare anche a distanza di anni dalla fine del trattamento) rappresenta la conferma dell'elevato controllo raggiunto nei confronti dell'infezione.

Limiti all'utilizzo degli Interferoni: L'interferone è controindicato nei pazienti con impotante leucopiastrinopenia, quindi nei soggetti con epatopatia avanzata che presentino segni clinici di insufficienza funzionale o severa ipertensione portale. Inoltre, costituiscono controindicazioni al trattamento la presenza di disturbi psichiatrici maggiori, la presenza di patologie autoimmuni, epilessia o malattie extraeptiche importanti. La presenza di diabete, tireopatie e cardiopatie non costituisce una controindicazione assoluta, ma comporta un'attenta valutaizone dei rischi/benefici.
Gli effetti collaterali più importanti riscontrati nel trattamento con Interferone sono: sindrome tipo influenzale, stanchezza, anoressia, perdita dei capelli, mielosoppressione, fenomeni auto-immuni, tiroiditi, ansietà e depressione.

Efficacia della terapia: i dati disponibili in letteratura

L' ***Interferone standard*** è stato il primo farmaco antivirale ad essere sperimentato nell'epatite cronica B, HBeAg negativa e nel tempo sono stati utilizzati 2 approcci terapeutici:

a) tra gli anni '86 e i '90 sono state somministrate dosi alte di interferone per 16-24 settimane [1-4];
b) successivamente, sono stati effettuati trattamenti più prolungati (12-24 mesi) ad un dosaggio medio di interferone (5-6 MU) [5-6].

La risposta alla terapia è caratterizzata dalla diminuzione progressiva dei livelli sierici di HBV-DNA seguita parallelamente, ma più lentamente da una diminuzione dei livelli delle tranaminasi (ALT). La risposta a fine terapia (livelli di HBV-DNA al di sotto di 1-10 pg/ml e ALT entro la norma) si ottiene nel 57% - 90% dei pazienti trattati. Tuttavia, dal 89 al 25% dei pazienti presenta una recidiva virologica ed epatitica dopo la sospensione del trattamento: l'elevata variabilità con cui è stato descritto l'evento è influenzata dai criteri usati nel monitoraggio post terapia, dall' eterogeneità della popolazione considerata e dalla durata del trattamento. In particolare, i dati disponibili dimostrano che maggiore è la durata del trattamento più alta è la percentuale di risposta sostenuta. Infatti, in trattamenti più brevi, è stato

riscontrato un tasso di recidiva più alto (50-89%), che si riduce al 25%-35% in caso di trattamento della durata di 24 mesi. In una significativa percentuale di casi al momento della recidiva dopo la sospensione del trattamento si osserva un'esacerbazione necrotica [1-2,4], in occasione della quale non sono mai stati segnalati episodi di scompenso dell'epatopatia. E' interessante notare che 3 diversi studi hanno riportato un persistente controllo della replicazione virale associato a remissione biochimica dopo tale picco necrotico, suggerendo la possibilità di una guarigione dell'epatite *"per seconda intenzione"* [1-2,4].
Durante il follow-up post trattamento (4,5 -7 anni) dei pazienti con risposta sostenuta si è osservata perdita dell'HBsAg nel 31,6 - 66,6% con sieroconversione ad anti-HBs nel 50-77% [6-8].

I dati relativi all'efficacia dell' ***Interferone Pegilato*** nell'epatite cronica B HBeAg negativa derivano principalmente da uno studio di fase III che ha reclutato oltre 537 pazienti (2/3 dei quali di origine asiatica) e che ha valutato l'efficacia del trattamento per 12 mesi con IFN pegilato alfa 2a con o senza lamivudina nei confronti della monoterapia con lamivudina. A 6 mesi dal termine del trattamento il 36% dei pazienti trattati con Peg-IFN in monoterapia e il 38% di quelli trattati con la combinazione avevano ALT normali e HBV DNA < 2000 IU/ml [9]. Recentemente sono stati presentati i dati relativi al 3° anno di follow-up post-terapia e dall'analisi ITT risulta che il 30% dei pazienti ha transaminasi nella norma e/o viremia < 2000 IU/ml. Nel corso dei 3 anni di monitoraggio si è infine osservato un aumento dei soggetti nei quali si è avuta la *clearance* dell'HBsAg, dal 3% osservato al sesto mese dopo la conclusione del trattamento fino all'8% [Marcellin P et al EASL 2007].

Impatto a lungo termine dell'IFN. L'impatto a lungo termine del trattamento con Interferone sulla progressione di malattia è stato valutato in 3 studi che hanno complessivamente analizzato 609 pazienti (413 trattati e 196 non trattati), seguiti con un follow-up di 4,5-6 anni [6-8]. Il trattamento con IFN (indipendentemente dalla risposta in uno studio, solo in caso di raggiungimento della risposta sostenuta negli altri 2) si è dimostrati in grado di rallentare la progressione di malattia e di diminuire le complicanze terminali della cirrosi. I dati a disposizione circa l'impatto del trattamento sull' epatocarcinoma (HCC), non permettono di trarre delle conclusioni definitive: 3 di 102 (2.95 %) pazienti con risposta sostenuta hanno sviluppato l'HCC rispetto a 27 dei 311 (8.7%) pazienti con recidiva o non risposta alla terapia. ($p= 0.086$, χ^2 2.954). Saranno pertanto necessari studi con adeguato follow-up e stratificazione sulla base della diagnosi iniziale (epatite cronica o cirrosi) per verificare se l'IFN riduce l'incidenza dell'HCC rallentando la progressione dell'epatite cronica in cirrosi o impedendo il processo oncogenetico nella cirrosi

Chi trattare. Nella pratica clinica occorre adattare le indicazioni generali delle linee guida alle esigenze del singolo malato per cercare di giungere ad una terapia individualizzata. In considerazione, della tendenza evolutiva dell'epatite cronica HBeAg negativa si può dire che tutti i pazienti sono potenzialmente "canditati" al trattamento. Tuttavia, nella pratica assistenziale occorre attuare un progetto terapeutico in ogni singolo paziente, tenendo conto dei limiti dei farmaci (efficacia, effetti collaterali, resistenza) in rapporto alla tendenza evolutiva della sua malattia [10]. Il trattamento con Interferone (Peg-IFN alfa 2 a 180 ug/sett per 12 mesi) è indicato nei pazienti con epatite cronica B con fibrosi anche iniziale e deve essere considerato come valida opzione terapeutica anche nei pazienti con cirrosi non avanzata.

Come migliorare il trattamento in futuro L'analisi dei fattori predittivi di risposta a 6 mesi dal termine del trattamento con Peg-IFN per 12 mesi ha dimostrato come, oltre all'età e al sesso, la presenza di elevati livelli di transaminasi e di bassi livelli di viremia siano fattori associati ad una più elevata probabilità di successo terapeutico [11]. Tale evidenza si associa a dati ottenuti con l'IFN standard, che dimostravano come la presenza al momento dell'inizio del trattamento di alti livelli di IgM anti-HBc e di bassi livelli di HBV-DNA correli con una più alta percentuale di risposta sostenuta. Ne deriva l'ipotesi che un trattamento iniziato in occasione delle periodiche riattivazioni di malattia (osservate in oltre il 50% dei pazienti) potrebbe essere una modalità di ottimizzazione terapeutica.
Lo stesso studio ha dimostrato come nei pazienti con infezione sostenuta da genotipo D, la probabilità di risposta fosse maggiore nel caso di trattamento combinato (Peg-IFN e LMV): il dato potrebbe essere viziato dalla relativa esiguità di pazienti analizzati e dalla breve durata del monitoraggio post-trattamento, in ogni caso futuri studi prospettici dovranno verificare la possibilità che la terapia di combinazione possa indurre tassi di risposta sostenuta più elevati.
Infine, recentemente è stato dimostrato come la riduzione in corso di terapia dei livelli di HBsAg associ con la probabilità di successiva perdita dell'antigene: tale evidenza apre alla possibilità di giungere ad una modulazione della durata della terapia sulla base dell'andamento dei livelli di HBsAg [Brunetto MR et al AASLD 2006].
Mentre la caduta dei livelli di HBV-DNA potrebbe permettere di identificare nei primi 3-6 mesi i pazienti non responders al trattamento, la caduta dei livelli di HBsAg potrebbe, nei successivi 6 mesi, identificare coloro che possono sospendere il trattamento al termine del primo anno di terapia da coloro che potrebbero beneficiare di un trattamento più prolungato.

REFERENCES :

1. Brunetto MR, Oliveri F, Rocca G, Criscuolo D, Chiaberge E, Capalbo M, et al. Natural course and response to interferon of chronic hepatitis B accompanied by antibody to hepatitis B e antigen. Hepatology 1989; 10: 198-202.
2. Pastore G, Santantonio T, Milella N, Monno L, Moschetta R, Pollice L. Anti-HBe positive chronic hepatitis B with HBV-DNA in the serum: response to a six month course of lymphoblastoid IFN. J Hepatol 1992; 14: 221-225.
3. Hadziyannis SJ, Bramou T, Makris A, Moussoulis G, Zignego L, Papaioannou C. Interferon alpha-2b treatment of HBeAg negative/serum HBV-DNA positive chronic hepatitis type B. J Hepatol 1990; 11 (suppl 1): S133-6.
4. Fattovich G, Farci P, Rugge M, Brollo L, Mandes A, Pontisso P, et al. A randomized controlled trial of lymphoblastoid IFN- alpha in patients with chronic hepatitis B lacking HBeAg. Hepatology 1992; 15: 584-589.
5. Lampertico P, Del Ninno E, Manzin A, Donato MR, Rumi MG, Lunghi G, Morabito A, Clementi M, Colombo M. A randomized, controlled trial of 24-month course of interferon alfa 2b in patients with chronic hepatitis B who had hepatitis virus DNA without hepatitis B e abtigen in serum. Hepatology 1997; 26: 1621-1625.
6. Lampertico P, Del Ninno E, Viganò M, Romeo R, donato MF, Sablon E, Morabito A, Colombo M Long-term suppression of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B by 24-month interferon therapy. Hepatology. 2003 Apr;37(4):756-63.
7. Papatheodoridis GV, Manesis E, Hadziyannis SJ. The long term outcome of interferon-alpha treated and untreated patients with HBeAg –negative chronic hepatitis B. J Hepatol 2001; 34: 306-313.
8. Brunetto MR, Oliveri F, Coco B, Leandro L, Colombatto P, Monti Gorin J and Bonino F. Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis in alpha-Interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. J Hepatol 2002; 36: 263-270.
9. Marcellin P, et al. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with for HBeAg-negative chronic hepatitis B. N Engl J Med 2004;351:1206–17.
10. Lok ASF and McMahon B Chronic hepatitis B, Hepatology, Vol. 45, 2, 2007 507-539
11. Bonino F, Marcellin P, Lau GK, Hadziyannis S, Jin R, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Brunetto MR, Farci P, Popescu M, McCloud P. Predicting response to peginterferon {alpha}-2a, lamivudine and the two combined for HBeAg-negative chronic hepatitis B. Gut. 2007 May;56(5):699-705. Epub 2006 Nov 24. 5
12. Brunetto MR, Oliveri F, Rocca G, Criscuolo D, Chiaberge E, Capalbo M, et al. Natural course and response to interferon of chronic hepatitis B accompanied by antibody to hepatitis B e antigen. Hepatology 1989; 10: 198-202.
13. Pastore G, Santantonio T, Milella N, Monno L, Moschetta R, Pollice L. Anti-HBe positive chronic hepatitis B with HBV-DNA in the serum: response to a six month course of lymphoblastoid IFN. J Hepatol 1992; 14: 221-225.
14. Hadziyannis SJ, Bramou T, Makris A, Moussoulis G, Zignego L, Papaioannou C. Interferon alpha-2b treatment of HBeAg negative/serum HBV-DNA positive chronic hepatitis type B. J Hepatol 1990; 11 (suppl 1): S133-6.
15. Fattovich G, Farci P, Rugge M, Brollo L, Mandes A, Pontisso P, et al. A randomized controlled trial of lymphoblastoid IFN- alpha in patients with chronic hepatitis B lacking HBeAg. Hepatology 1992; 15: 584-589.
16. Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, Capalbo M, Barbera C, Bonino F. Treatment of chronic anti-HBe positive hepatitis B with interferon-alpha. J Hepatol 1995; 22 (suppl 1): 42-44.
17. Lampertico P, Del Ninno E, Manzin A, Donato MR, Rumi MG, Lunghi G, Morabito A, Clementi M, Colombo M. A randomized, controlled trial of 24-month course of interferon alfa 2b in patients with chronic hepatitis B who had hepatitis virus DNA without hepatitis B e abtigen in serum. Hepatology 1997; 26: 1621-1625.
18. Lampertico P, Del Ninno E, Viganò M, Romeo R, donato MF, Sablon E, Morabito A, Colombo M Long-term suppression of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B by 24-month interferon therapy. Hepatology. 2003 Apr;37(4):756-63.
19. Manesis EK, Hadziyannis SJ. Interferon alpha treatment and retreatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. Gastroenterology 2001; 121: 101-109.
20. Papatheodoridis GV, Manesis E, Hadziyannis SJ. The long term outcome of interferon-alpha treated and untreated patients with HBeAg –negative chronic hepatitis B. J Hepatol 2001; 34: 306-313.
21. Brunetto MR, Oliveri F, Coco B, Leandro L, Colombatto P, Monti Gorin J and Bonino F. Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis in alpha-Interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. J Hepatol 2002; 36: 263-270.
22. Oliveri F, Santantonio T, Bellati G, Colombatto P, Colloredo Mels G, Carriero L, Dastoli G, et al. Long term response to therapy of chronic anti-HBe positive hepatitis B is poor independent of type and schedule of interferon. Am J Gastroenterol 1999, 94; 5: 1366-1372

23. Lobello S, Lorenzoni U, Vian A, Floreani A, Brunetto MR, Chiaramonte M Interferon treatment in hepatitis B surface antigen-positive hepatitis e antibody-positive chronic hepatitis B: role of hepatitis B core antibody IgM titre in patients selection and treatment monitoring. J Viral Hep 1998; 5: 61-66.

TREATMENT OF HBEAG NEGATIVE CHRONIC HEPATITIS B WITH NA: RECOMMENDATIONS OF THE ITALIAN CONSENSUS WORKSHOP, STRESA 2007

Antonio Craxì

Patients with Ishak stage ≤ 3 fibrosis can be monitored or treated with IFN or PEG IFN, as outlined for HBeAg positive (AII)

In patients with Ishak stage > 3 fibrosis IFN or PEG IFN or NA can all be considered as first choice. Since both types of therapy have important limitations (Peg-IFN: low efficacy and significant side effects, NAs need to be taken long term, possibly life-long with variable risk of developing resistant mutants) patients must be fully informed and should participate in the choice of therapy.

Treatment with NAs requires the protracted, possibly indefinite, administration of the NA. NAs should be selected according both to the degree of HBV inhibition (antiviral efficacy) and to the risk of development of NA resistant HBV mutants (A II). According to currently available data monotherapy should be considered with:

a) Entecavir
b) Telbivudine
c) Adefovir

"De novo" combination therapy with a nucleoside and a nucleotide seems to be a reasonable option, however evidence based data on its use as first line treatment are lacking (CIII). Monotherapy with Lamivudine must never be used due to the high risk of developing viral resistance.

In patients with high baseline viremia (>2.000.000 IU/mL) entecavir monotherapy or "de Novo" combination therapy (with the limitation of the lack of evidence based data) should be preferred (CIII).

Virologic monitoring for HBV-DNA and resistance testing should be the same recommended in HBeAg-positive patients.

In patients on Interferon who maintain HBV-DNA levels greater than 200.000 IU/mL after 24 weeks of treatments, withdrawal should be considered because of the low probabilities of sustained response (CIII)

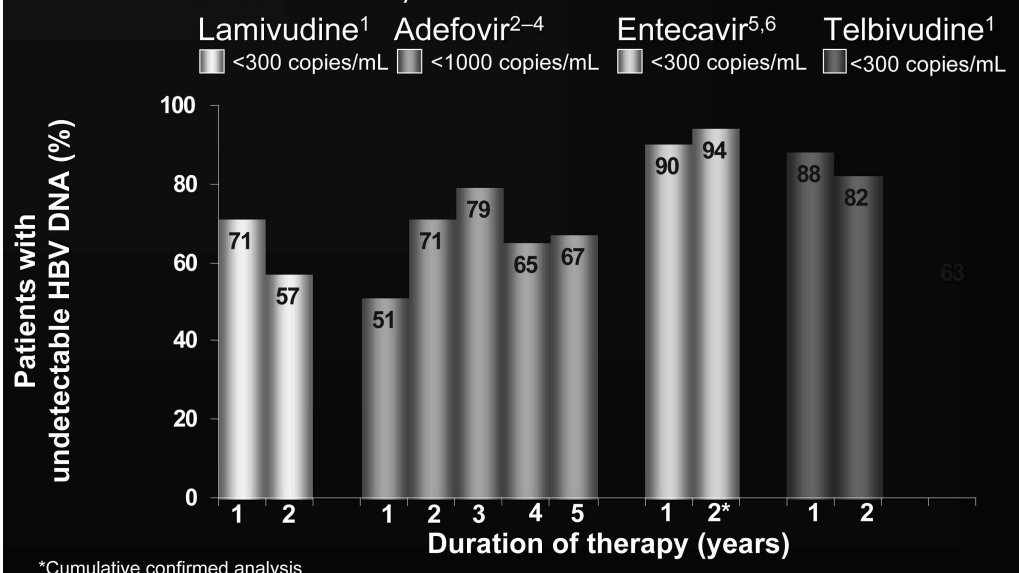
Management of resistance or suboptimal response to NA is similar to that in HBeAg-positive patients. Resistance testing should be used as in HBe-Ag positive patients.

Available nucleoside and nucleotide analogs active against HBV

- Drugs approved by EMEA and FDA for HBV
  - Adefovir dipivoxil (Hepsera®)
  - Entecavir (Baraclude®)
  - Lamivudine (Epivir®)
  - Telbivudine (Sebivo®, Tyzeka™)
- Drugs approved for HIV, also active against HBV
  - Emtricitabine (Emtriva®)
  - Tenofovir (Viread®)
  - Emtricitabine/tenofovir (Truvada™)

Antiviral potency of analogs in HBeAg negative nucleoside-naïve patients: undetectable HBV DNA

Collation of currently available data – not from head-to-head studies



*Cumulative confirmed analysis

1. Lai CL, et al. 57th AASLD Meeting 2006, Boston USA. Oral presentation. *Hepatology*. 2006; 44(4, suppl 1):222A (Abstract 91); 2. Hadziyannis SJ, et al. *N Eng J Med.* 2003; 348:800-7; 3. Hadziyannis SJ, et al. *N Eng J Med.* 2005; 352:2673-81; 4. Hadziyannis SJ, et al. *Hepatology.* 2005; 42 (suppl 1):754A (Abstract LB14); 5. Lai CL, et al. *N Eng J Med.* 2006; 354:1011-20; 6. Shouval D, et al. 41st EASL Meeting 2006, Vienna, Austria. Oral presentation. *J Hepatol.* 2006; 44(suppl 2):S21-2 (Abstract 45)

Annual Prevalent Resistance Rates for Lamivudine, Adefovir, Entecavir, Emtricitabine and Telbivudine

DRUG	Resistance at year of therapy expressed as percentage of patients				
	1	2	3	4	5
Lamivudine[a]	23	46	55	71	80
Adefovir[b] (naïve HBeAg-neg)	0	3	11	18	29
Adefovir (LAM resistant)[c]	0-18	–	–	–	–
Entecavir[d] (naïve)	0.1	0.4	1.1	1.1	–
Entecavir[d] (LAM resistant)	6	15	35	43	–
Emtricitabine[d]	9-16	19- 37	–	–	–
Telbivudine[e] (HBeAg-pos)[f]	4.4[d]	21.6[e]			
(HBeAg-neg)[f]	2.7	8.6			

[a]Modified and updated from Lai CL, et al, 2003 and Leung V, et al. 2001; [b]from Locarnini S, et al. 2005; Hadziyannis S, et al. 2005. *NEJM*. 352:2673.; [c]from Lee, Y-S et al. *Hepatology*. 2006;43:1385. [d]from Perrillo RP, et al. 2005; and Colonno, et al. 2006. [e]In the LAM comparator arm, the percentage was only 8% based on a complex case definition of antiviral drug resistance/treatment failure. One would thus expect a comparable relative level [f]of 10-12% based on genotypic resistance compared with Lamivudine (25% per annum).e Lok A & McMahon B; *Hepatology*. 2007;45:507.

AASLD guidelines, 2007

Table 9. Responses to Approved Antiviral Therapies Among Treatment-naive Patients with HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B

	Standard IFN-α 5 Mu qd or 10 MU tiw 6-12 mo	Control	Lamivudine 100 mg qd 48-52 wk	Placebo	Adefovir 10 mg qd 48 wk	Placebo	Entecavir 0.5 mg qd 48 wk	Telbivudine 600 mg qd 52 wk	Peg IFNα 180 mcg qw 48 wk	PegIFN-α 180 mcg qw+ Lamivudine 100 mg qd 48 wk
Loss of serum HBV DNA*	60-70%	10-20%	60-73%	na	51%	0	90%	88%	63%	87%
Normalization of ALT	60-70%	10-20%	60-79%	na	72%	29%	78%	74%	38%	49%
Histologic improvement	na	na	60-66%	na	64%	33%	70%	67%	48%^	38%^
Durability of response	10-20%		<10%		~5%		na	na	~20%	~20%

*Hybridization or branched chain DNA assays (lower limit of detection 20,000-200,000 IU/ml or 5-6 log copies/ml) in standard IFN-α studies and some lamivudine studies, and PCR assays (lower limit of detection approximately 50 IU/ml or 250 copies/ml) in other studies

na = not available

^Post-treatment biopsies obtained at week 72

Lok ASF & McMahon BJ. *Hepatology*. 2007; 45:507–39;

AASLD guidelines, 2007

Table 11. Comparison of Approved Treatments of Chronic Hepatitis B

	IFNα	Lamivudine	Adefovir	Entecavir	Telbivudine
Indications					
HBeAg+, normal ALT	Not indicated	Not indicated	Not indicated	Not indicated	Not indicated
HBeAg+ chronic hepatitis	Indicated	Indicated†	Indicated	Indicated	Indicated†
HBeAg- chronic hepatitis	Indicated	Indicated†	Indicated	Indicated	Indicated†
Duration of treatment					
HBeAg+ chronic hepatitis	4-12 months#	≥1 year**	≥ 1 year**	≥1 year**	≥1 year**
HBeAg− chronic hepatitis	1 year	> 1 year	> 1 year	>1 year	>1 year
Route	Subcutaneous	Oral	Oral	Oral	Oral
Side effects	Many	Negligible	Potential Nephrotoxicity	Negligible	Negligible
Drug resistance	-	~20%, year 1 ~70%, year 5	None, year 1 29%, year 5	<1% up to year 2^	~25% up to year 2
Cost*	High	Low	Intermediate	High	Intermediate

*Based on treatment duration of 1 year
#PegIFN approved for 12 months
**Treatment for at least 12 months continuing for at least 6 months after anti-HBe seroconversion
^Entecavir resistance reported within year 1 in patients with prior lamivudine resistance
†Not preferred drug due to high rate of resistance

Lok ASF & McMahon BJ. *Hepatology*. 2007; 45:507–39;

When to stop NA therapy in CHB

- HBeAg negative (precore and core promoter mutants)
  - HBsAg clearance is the only stable endpoint
  - HBV DNA relapse almost universal after stopping oral therapy
  - Durable suppression of HBV DNA to low or undetectable for several years might decrease the relapse rate
  - NA: >1 year (<u>may be lifelong</u>)

Lok ASF & McMahon BJ. *Hepatology*. 2007; 45:507-39.

Management of HBV primary non-response to analogs

- If a primary nonresponse is identified
  - Switch therapy
    - Early
    - Before resistance develops
- Avoid primary nonresponse
  - Start with potent monotherapy associated with low rate of viral resistance
- No known advantage of combination therapy (add) vs switch to *potent antiviral* in patients with suboptimal response in terms of depth of viral suppression

Potential role of combination therapy for HBV

- Advantages
  - Reduced rate of resistance
  - Potential for added efficacy
- Disadvantages
  - Greater cost
  - Potential for increased toxicity
- Potential patient populations
  - Patients with HBV antiviral drug resistance
  - Patients with cirrhosis
  - After liver transplantation
  - All patients?

Will de novo combination therapy be superior to monotherapy?

- **PegIFN + NA**
  - **More potent NA with higher genetic barrier to resistance**
  - **Combination therapy followed by maintenance NA**
- **NA + NA**
  - **Same target but different binding sites and no cross resistance**
- **Two antivirals – different targets, e.g. viral entry + viral polymerase inhibitors**

HBeAg negative - treat to obtain :

- clearance of HBsAg (→ anti-HBs) rarely achieved
- inhibition of HBV replication, control of ALT; halt disease progression

Indefinite therapy

Italian HBV Consensus, 2007

Key role of the stage of liver disease (ALT and fibrosis) for the indication and type of treatment

Active and persistent HBV replication

(HBV-DNA >2000 IU/ML)

+

Elevated ALT (> 2 unl) and at least Ishak S2 at biopsy

Two scenarios

Italian HBV Consensus, 2007

ISHAK STAGE 2

Peg-IFN

If Peg-IFN not applicable, monitor course of disease (serial liver biopses, elastography?)

ISHAK STAGE ≥ 3

Peg-IFN and NA

Patients must be fully informed and participate in the choice of therapy

Italian HBV Consensus, 2007

Factors influencing choice of HBV therapy

- Primary decision: peginterferon alfa-2a vs oral agent
- Peginterferon an option in a patient with
  - Genotype A
  - Low HBV DNA
  - High ALT
  - No comorbidities
  - Desire for a fixed duration of therapy and avoidance of resistance
- Choice of oral agent dependent on
  - Potency: highest with entecavir and telbivudine
  - Rate of resistance: lowest with entecavir
  - Cost: lowest with lamivudine and lower with telbivudine
  - Safety: good for all oral agents
  - Special circumstances, eg, pregnancy (telbivudine class B and lamivudine good safety experience), HIV coinfection, presence of cirrhosis, etc

LA TERAPIA DELLA CIRROSI EPATICA COMPENSATA DA VIRUS B (HBV)

Vito Di Marco

La storia naturale della malattia cronica da HBV è ampiamente variabile. Il controllo dell'evoluzione della malattia rappresenta l'obiettivo prioritario del trattamento antivirale, la cui efficacia ultima è misurabile indirettamente tramite l'effetto sui parametri biochimici, virologici e clinici.
La cirrosi epatica da virus B è una malattia progressiva, caratterizzata da un alto rischio di complicanze ed elevato tasso di mortalità. Negli anni passati, in assenza dei trattamenti antivirali, circa il 50% dei pazienti sviluppava una grave complicanza epatica e circa il 40% moriva per insufficienza epatica nell'arco di 10 anni. (1)
I **principali obiettivi** del trattamento della cirrosi epatica da virus dell' epatite B sono:

1. Prevenzione dell'evoluzione in cirrosi e dello scompenso della malattia
2. Prevenzione dell'insorgenza di epatocarcinoma.
3. L'aumento della sopravvivenza

I **momenti fondamentali** del trattamento della cirrosi epatica da virus B sono:

1. Selezione del paziente candidato alla terapia: stadio delle malattia, livelli sierici di HBV-DNA, genotipo virale, precedenti terapie praticate
2. Scelta del farmaco: potenza antivirale e barriera genetica, tollerabilità ed effetti collaterali, costi
3. Monitoraggio del paziente in trattamento: valutare la soppressione virologica, gli eventi virologici durante la terapia come la sieroconversione HBeAg/anti-HBe o la perdita dell'HBsAg.
4. Valutazione dell'efficacia della terapia: risposta virologica mantenuta nel tempo e comparsa di mutazioni virali che induco resistenza alla terapia.

Il primo punto fondamentale è la <u>selezione del paziente candidato alla terapia</u>. La diagnosi di cirrosi epatica si basa sull' esame istologico della biopsia epatica o sui dati clinici (presenza di leuco-piastrinopenia, evidenza ecografica di segni di ipertensione portale e riscontro endoscopico di varici esofagee). E' importante stabilire lo stato virologico perché la presenza dell'HBeAg suggerisce come obiettivo primario della terapia la sieroconversione, mentre sua assenza pone come obiettivo la profonda e stabile soppressione dei livelli dell'HBV-DNA sierico. Nella nostra area geografica la ricerca del genotipo virale ha un'importanza relativa perché oltre il 90% dei pazienti è infettata con il genotipo D. I flussi migratori suggeriscono una particolare attenzione nel caso di pazienti con cirrosi epatica provenienti da aree geografiche dove sono prevalenti altri genotipi. La valutazione quantitativa dell'HBV-DNA sierico è diventata fondamentale nella valutazione del trattamento nei pazienti con cirrosi epatica compensata. Le linee guida pubblicate negli ultimi cinque anni (EASL 2003, APASL 2005, AASLD 2007) hanno posto come criterio per il trattamento la presenza di una viremia superiore a 10.000-1000.000 copie/mL (pari a 2.000-20.000 UI/mL).
Per la <u>scelta del farmaco</u> bisogna tener conto della potenza antivirale e della barriera genetica di ogni farmaco, della tollerabilità e della frequenza di effetti collaterali e dei costi. E' anche importante valutare gli studi clinici pubblicati per somministrare al singolo paziente il farmaco che ha dimostrato le migliori evidenze cliniche di efficacia.
I <u>farmaci disponibili</u> per il trattamento della cirrosi epatica compensata sono l'interferone, la lamivudina, l'adefovir dipivoxil e l'entecavir
L'interferon ha il vantaggio di essere utilizzato per una durata definita di trattamento, tra i 6 e i 24 mesi, con una risposta sostenuta nel 10-30% dei casi.

Gli svantaggi comprendono l'elevato costo, almeno rispetto ad altri farmaci usati per lo stesso periodo di tempo, la somministrazione per via parenterale, le numerose controindicazioni e i frequenti effetti collaterali.
Recentemente sono stati pubblicati i risultati di un trial randomizzato sull' efficacia del Peg-interferon alfa 2b da solo o combinato con lamivudina nei pazienti HBeAg positivi. Nello studio erano inclusi 70 pazienti con fibrosi avanzata (score 4-6 di Ishak) e tra questi 24 avevano una chiara cirrosi epatica. I pazienti ricevevano 100 μg/settimana di Peg-IFN da solo o combinato a 100 mg/die di lamivudina per 52 settimane ed erano per la sieroconversione HBeAg/antiHBe e per la riduzione dei livelli di HBV-DNA < 10.000 copie/mL alla 78° settimana. Il 25% dei pazienti con fibrosi avanzata e il 30% dei pazienti con cirrosi ottenevano una risposta virologica, ma gli effetti collaterali (astenia, anoressia, trombocitopenia) erano più frequenti tra i pazienti con fibrosi avanzata o cirrosi. Gli autori dello studio concludono che dato che la terapia con Peg-Interferon ottiene una buona percentuale di risposta virologica anche dopo la sua sospensione e gli effetti collaterali non sono gravi, è opportuno valutare questa opzione terapeutica nei pazienti HBeAg positivi con fibrosi avanzata o cirrosi.
Non esistono studi randomizzati e controllati di trattamento con interferone verso placebo in pazienti con cirrosi epatica HBeAg negativa, ma sono stati pubblicati tre studi di coorte che comprendono anche un sottogruppo di pazienti con severa fibrosi o cirrosi epatica (3-5). Questi studi dimostrano che la terapia con interferone è efficace nel mantenere una prolungata risposta biochimica e virologica dopo la fine del trattamento nel 20-30% dei pazienti trattati. La risposta terapeutica previene il rischio di scompenso della cirrosi, mentre più incerto è l'effetto sullo sviluppo di epatocarcinoma. Nell'ultimo decennio sono stati introdotti i farmaci antivirali analoghi nucleosidici e nucleotidici. Il primo farmaco introdotto è stato la lamivudina, analogo nucleosidico che interferisce con la replicazione del virus B all'interno degli epatociti, riducendo i livelli di HBV DNA nel siero. I vantaggi di questo farmaco sono la somministrazione orale, l'assenza di effetti collaterali, l'assenza di controindicazioni e il basso costo mentre gli svantaggi sono l'elevato tasso di recidiva dopo trattamenti di breve durata e l'elevato tasso di farmaco-resistenza per trattamenti di durata superiore ai 12 mesi. In uno studio randomizzato e controllato di trattamento condotto in 651 pazienti asiatici (85% di sesso maschile, 58% HBeAg positivi, 80% con HBV DNA >700.000 Eq/mL) con fibrosi severa (≥ 4 nello score di Ishak) o cirrosi compensata, 436 pazienti sono stati randomizzati al trattamento continuativo con lamivudina monoterapia per una media di 32 mesi (0-42) e 215 sono stati trattati con placebo (6). La malattia epatica progrediva nell'8% dei pazienti trattati con lamivudina e nel 18% dei pazienti trattati con placebo (p= 0.001) mentre il 4% dei pazienti trattati con lamivudina e il 7,4% di quelli trattati con placebo sviluppavano un epatocarcinoma (p=0,047). Il 49% trattati con lamivudina sviluppavano una resistenza alla lamivudina e la malattia epatica peggiorava in <1% dei pazienti che mantenevano la risposta virologica alla lamivudina rispetto al 7% di quelli che sviluppavano farmacoresistenza (p<0.001). In uno studio multicentrico italiano di coorte (7), 198 pazienti con cirrosi compensata HBeAg-negativa sono stati trattati con 100 mg/die di lamivudina per una mediana di 24 mesi (1-66). Il 94% dei pazienti ha ottenuto una risposta virologica durante il trattamento, ma solo il 40% ha mantenuto questa risposta dopo 4 anni di trattamento per la comparsa di ceppi virali lamivudina-resistenti. La malattia epatica è progredita nel 4% dei pazienti che hanno mantenuto una risposta virologica e nel 24% di quelli che hanno sviluppato lamivudina resistenza. L'epatocarcinoma si è sviluppato nel 15% dei pazienti con risposta prolungata e nel 35% di quelli con resistenza e la sopravvivenza era significativamente migliore nei pazienti che hanno mantenuto una risposta virologica rispetto a quelli che hanno sviluppato lamivudina resistenza. Questo e altri studi dimostrano che il trattamento continuo con lamivudina rallenta la progressione della malattia epatica ridu-

cendo il rischio di scompenso epatico nei pazienti con cirrosi. Più incerto è l'effetto di questo farmaco sulla prevenzione dell'epatocarcinoma. Tuttavia, l'effetto favorevole della lamivudina sulla storia naturale della cirrosi da HBV è tempo dipendente, cioè si riduce con il prolungamento della terapia per la comparsa di lamivudina resistenza e dopo 3-4 anni di terapia, l'effetto favorevole del farmaco interessa solo il 40-50% dei pazienti che non ha ancora sviluppato resistenza al farmaco. La ripresa della replicazione virale che si osserva alla comparsa di lamivudina resistenza determina un rapido peggioramento della malattia epatica. Un altro farmaco oggi disponibile è l'adefovir dipivoxil, un analogo nucleotidico efficace sia nei pazienti naive sia nei pazienti che hanno sviluppato resistenza alla lamivudina. L'incidenza di resistenza da adefovir è 0% dopo 1 anno di trattamento, 2% dopo 2 anni e 3,9% dopo 3 anni per arrivare al 18% dopo 5 anni (17). Non esistono studi randomizzati controllati o di coorte di trattamento prolungato con adefovir in pazienti naive con cirrosi epatica. Sono disponibili solo i risultati di studi di coorte di trattamento con adefovir in pazienti con cirrosi che avevano sviluppato lamivudina resistenza. Nei pazienti con resistenza alla lamivudina possono essere utilizzate 2 strategie. La strategia di "switch to" prevede la somministrazione dell'Adefovir e la sospensione della lamivudina, mentre la strategia di "add on" prevede l'aggiunta della terapia con Adefovir alla terapia con lamivudina. I pazienti con lamivudina resistenza trattati con solo Adefovir hanno un rischio del 25% circa di sviluppare le mutazioni rtN236T e rtA181V che sono associate alla resistenza all'adefovir, mentre la strategia "add on" riduce notevolmente il rischio di sviluppare resistenza all'Adefovir.

Uno studio recentemente pubblicato ( ) riporta i dati di 145 pazienti con resistenza alla lamivudina (86% HBeAg negativie 92% con genotipo D) trattati con 10 mg/die di Adefovir in associazione a 100 mg/die di Lamivudina. Durante un follow-up l'80% dei pazienti otteneva una soppressione dell'HBV-DNA sierico e l'84% la normalizzazione delle transaminasi e in nessuno paziente è stato osservato un breakthrough virologico o clinico.

Nessuno dei 94 pazienti con cirrosi sviluppò uno scompenso della malattia durante i 3 anni di follow-up, ma 11 pazienti (12%) svilupparono un epatocarcinoma. In pazienti l'HCC si è sviluppato dopo la clearance dell'HBV-DNA , mentre 5 pazienti avevano un HBV-DNA positivo quando svilupparono l'HCC. La probabilità cumulativa a 4 anni di sviluppare l'epatocarcinoma era del 15%.

Infine, per quanto riguarda l'entecavir che l'ultimo farmaco entrato nella pratica clinica, non sono disponibili dei dati sui pazienti con cirrosi epatica, ma la somministrazione del farmaco nei pazienti naive con alta replicazione virale può determinare una veloce riduzione dei livelli della viremia come avviene nei pazienti con epatite cronica e ridurre il rischio di progressione della malattia.

Punti chiave:

- *Il trattamento con interferone (standard o peghilato) i può determinare una risposta virologica sostenuta nel tempo nel 20-30% dei pazienti con cirrosi epatica da HBV compensata.*
- *La terapia con lamivudina riduce l'incidenza di scompenso della cirrosi e dell'epatocarcinoma rispetto ai pazienti non trattati, ma l'effetto positivo della terapia si perde dopo l'emergenza di ceppi virali resistenti al farmaco.*
- *La terapia con adefovir nei pazienti con cirrosi epatica e con resistenza alla lamivudina riduce in maniera significativa gli eventi di scompenso ma non annulla il rischio di sviluppo dell'epatocarcinoma.*

REFERENCES

1. Fattovich G et al. Effect of hepatitis B and C virus infections on the natural history of compensated cirrhosis: a cohort study of 297 patients. Am J Gastroenterol. 2002;97:2886-95.
2. Buster EH et al. Peginterferon alpha-2b is safe and effective in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with advanced fibrosis. Hepatology. 2007;46:388-94.
3. Papatheodoridis GV, et al. The long-term outcome of interferon-alpha treated and untreated patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. J Hepatol 2001; 34 306-313.
4. Brunetto MR, et al. Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. J Hepatol 2002;36: 263–270.
5. Lampertico P, et al. Long-term suppression of hepatitis B e antigen–negative chronic hepatitis B by 24-month interferon therapy. Hepatology 2003;37:756-763.
6. Liaw Y-F, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. N Eng J Med 2004;351:1521-1531.
7. Di Marco V, et al. Clinical outcome of HBeAg-negative chronic hepatitis B in relation to virological response to lamivudine. Hepatology 2004;40:883-891.
8. Lampertico P et al. Low Resistance to Adefovir Combined With Lamivudine: A 3-Year Study of 145 Lamivudine-Resistant Hepatitis B Patients. Gastroenterology 2007; 133: 1445-1451

MANAGEMENT CLINICO DELLA RESISTENZA AI NUCLEOS(T)IDI ANTI-HBV

Massimo Levrero
Dipartimento di Medicina Interna - Sapienza Università - Roma
Laboratorio di Espressione Genica – Fondazione A. Cesalpino - Roma

I farmaci attualmente utilizzati contro l'epatite cronica B sono gli interferoni-a e gli analoghi nucleosidici o nucleotidici. L'uso dell'interferone prevede cicli di terapia con durata definita (4-6 mesi per l'interferone classico e 12 mesi mer il PEG-IFNa nella malattia HBeAg positive e 12-24 mesi nella malattia anti-HBe positiva) con un intento curativo i.e. l'induzione di una risposta terapeutica sostenuta nel tempo) mentre i trattamenti con gli analoghi nicleos(t)idici prevedono di fatto un trattamento a tempo indeterminato volto alla soppressione attiva della replicazione virale.
I farmaci utilizzati contro l'epatite cronica B agiscono su specifiche fasi del ciclo di replicazione del virus HBV, con il risultato finale di inibirlo. Il ciclo di replicazione virale ha inizio con l'interazione del virione HBV con un recettore di superficie (peraltro tuttora non identificato con precisione) e il suo ingresso nell'epatocita. La particella core dell'HBV migra all'interno del nucleo dell'epatocita, dove il suo genoma è convertito in una forma circolare (cccDNA, *covalently closed circular* DNA), che costituisce il templato o stampo per la trascrizione degli RNA messaggeri (mRNA) virali ad opera di una RNA polimerasi DNA-dipendente cellulare. Gli mRNA virali, che comprendono sia l'RNA pre-genomico che gli RNA specifici per le diverse proteine virali, vengono trasferiti nel citoplasma dove avviene la sintesi delle proteine virali strutturali e non. Le proteine core assemblano a formare le particelle core che fungono da capside virale (struttura proteica che avvolge il genoma virale) e incorporano l'RNA virale genomico e la polimerasi virale. All'interno delle particelle core la polimerasi virale, dotata di una doppia attivita DNA polimerasi RNA-dipendente e DNA polimerasi DNA-dipendente, provvede prima alla retrotrascrizione dell'RNA pre-genomico in DNA a singola catena e successivamente alla sintesi della seconda catena DNA. La particella core matura viene ricoperta dalle proteine dell'envelope a livello del reticolo endoplasmico e la particella virale completa risultante viene rilasciata in circolo. Una piccola quota di particelle core mature non viene secreta ma rientra nel nucleo dove il genoma HBV a doppia catena DNA può essere nuovamente convertito a cccDNA. L'accumulo ed il mantenimento di un serbatoio stabile di molecole cccDNA a livello del nucleo dell'epatocita svolge un ruolo fondamentale nella persistenza dell'infezione.
L'IFNa agisce con un effetto combinato di stimolazione della risposta immunitaria e di azione antivirale diretta. L'inibizione della replicazione virale da parte dell'IFNa si esplica attraverso una significativa riduzione della sintesi delle proteine virali, degli RNA citoplasmatici e degli intermedi replicativi del DNA. Gli analoghi nucleosidici e nucleotidici inibiscono la replicazione del DNA virale attraverso un meccanismo di competizione con i substrati naturali della polimerasi/trascrittasi inversa di HBV, l'enzima essenziale per la replicazione virale che coordina l'assemblamento dei nucleocapsidi virali e interviene nella retrotrascrizione dell'RNA e nella sintesi del DNA.
Gli analoghi nucleosidici e nucleotidici che sono oggi a disposizione o che sono in fase avanzata di sperimentazione possono essere suddivisi essenzialmente in tre gruppi sulla base della struttura chimica. Gli ***L-nucleosidi*** vengono incorporati nell'HBV DNA di nuova sintesi causando la terminazione della catena e inibendo quindi la replicazione virale. Inoltre, alcuni di loro inibiscono anche l'attività di retrotrascrizione della polimerasi/trascrittasi inversa. Gli L-nucleosidici attualmente disponibili sono la ***lamivudina (LAM)*** e la ***telvibudina (TLD). Adefovir (ADV)*** e ***tenofovir (TDV)*** (attivo sia contro HBV che

HIV e a tutt'oggi ancora utilizzabile solo nei pazienti con coinfezione HIV-HBV) appartengono al gruppo dei ***nucleotidi aciclici***. Al gruppo dei ***ciclopentani*** appartiene l'***entecavir***, analogo carbociclico della 2'-deossiguanosina.

La farmaco-resistenza HBV

La terapia con analoghi nucleos(t)idici a lungo termine aumenta drammaticamente il rischio di farmaco-resistenza per selezione di mutanti virali che presentano una sensibilità ridotta al farmaco utilizzato. Sotto la pressione dell'antivirale i virus che subiscono delle mutazioni naturali resistenti al farmaco replicano e finiscono per prevalere rispetto ai virus selvaggi ("wild-type") inibiti dal farmaco. Questo fenomeno fa sì che il farmaco sia meno attivo con un aumento del dosaggio necessario per ottenere il 50% di inibizione virale. Tale aumento viene usualmente misurato come "fold-resistance" rispetto ad una attivita' pari ad 1 del farmaco contro il virus selvaggio).

Le mutazioni a carico della polimerasi virale, specifiche per ogni farmaco o gruppo di farmaci con caratteristiche chimiche simili, che conducono alla resistenza dell'HBV agli analoghi nucleos(t)idici si raggruppano tipicamente nelle vicinanze del sito di legame con i substrati naturali e comportano solitamente una riduzione dell'incorporazione dell'analogo nel DNA virale. Dalle analisi cristallografiche è emerso che le mutazioni riguardanti il motivo YMDD (tipiche della resistenza alla LAM, attualmente la più nota e diffusa tra gli analoghi utilizzati nell'epatite B) alterano la capacità dell'analogo nucleosidico di accedere all'apposito sito di legame della polimerasi e di ostacolare quindi la normale attività dell'enzima. Il meccanismo di resistenza sembra dovuto al diverso ingombro sterico all'interno del sito di legame con i nucleosidi, con alterazione della capacità della polimerasi di legare gli analoghi nucleosidici. Un secondo meccanismo e' legato ad una diminuita efficienza catalitica della polimerasi dovuta ad alterazioni di specifiche zone della polimerasi anche lontane dal sito di legame ma che ne alterano la geometria ed influiscono negativamente sull'incorporazione dell'analogo nucleosidico nel DNA virale.

L'insorgenza di farmaco-resistenza si associa a diversi eventi virologici e clinici. La selezione di un mutante HBV farmaco resistente **(resistenza genotipica)** rappresenta anche temporalmente il primo evento, seguito poi dall'aumento della viremia di almeno un log rispetto al punto di maggiore diminuzione della carica virale in seguito al trattamento antivirale (nadir) **(breakthrough virologico)** e quindi, anche dopo diverse settimane o mesi, l'aumento delle ALT **(breakthrough clinico)** e il peggioramento clinico.

La determinazione dell'insorgenza di resistenza in fase genotipica sembra avere una notevole importanza dal punto di vista terapeutico, poiché l'inizio della terapia di rescue in questa fase (con l'aggiunta di ADV a LAM) sembra in grado di evitare il breakthrough clinico e di riportare in tempi molto più rapidi la viremia a valori non rilevabili.

Dimostrazione della farmaco-resistenza.

La conferma dell'insorgenza di una farmaco-resistenza HBV richiede diverse valutazioni. Innanzitutto è indispensabile identificare la presenza di un fallimento della terapia. Quindi è necessario escludere che tale fallimento sia da imputare a cause non legate all'HBV, per esempio errori nel dosaggio del farmaco o scarsa adesione al trattamento. La resistenza può essere inoltre stabilita attraverso una caratterizzazione genotipica, con individuazione di un mutante attraverso il sequenziamento del menoma o con metodiche di ibridizzazione. Se non si conosce l'impatto della mutazione identificata sull'efficacia antivirale è necessario determinarla con una caratterizzazione fenotipica.

I test di **genotipizzazione** analizzano le sequenze di acidi nucleici dell'HBV nella regione del genoma bersaglio dell'antivirale in esame e valutano le sequenze degli aminoacidi tipicamente sostituite quando

insorge resistenza con il tipo di trattamento utilizzato. Il test di riferimento è il *sequenziamento_diretto dei prodotti della PCR*. In questo caso vengono sequenziate intere popolazioni di molecole virali ed e' quindi possibile rilevare una mutazione solo se è sufficientemente frequente nell'ambito della popolazione generale del virus. Il vantaggio è che con questa metodica è possibile rilevare ogni nuova mutazione, ed è quindi importante nelle indagini sulla resistenza di nuovi agenti antivirali. Un test diffusamente utilizzato per le caratterizzazioni genotipiche è il Trugene-HBV, che sequenzia una regione di circa 500 nucleotidi ed è in grado di confrontare le sequenze rilevate dal campione da analizzare con quelle di partenza presenti nel database. I passaggi di questa metodica, piuttosto semplice, sono essenzialmente due: amplificazione del genoma virale direttamente dai campioni di siero e lettura, previo sequenziamento. Il *test di ibridazione-inversa LiPA* fornisce solo informazioni su mutazioni già note associate a farmaco-resistenza. Il vantaggio è che è possibile rilevare la presenza di mutazioni resistenti più precocemente che con il sequenziamento diretto. Si tratta di un esempio di tecnologia a ibridizzazione inversa, in cui i probe (breve sequenza nota di DNA usata per la rilevazione di una sequenza nucleotidica complementare) sono immobilizzati su una membrana di nitrocellulosa. I prodotti della PCR contenenti il DNA virale amplificati dal campione in esame vengono denaturati (per ottenere filamenti singoli) e incubati con una striscia del test contenenti i probe. Su questi ultimi avviene l'ibridizzazione con le sequenze nucleotidiche complementari contenute nel campione da analizzare. Le singole sequenze nucleotidiche, dopo incubazione con un coniugato della streptavidina, appariranno colorate nei punti della striscia in cui si trovano i probe noti corrispondenti e verranno riconosciute sulla base della loro posizione sulla striscia. Per caratterizzare la frequenza delle mutazioni e la variabilità nel tempo è necessario sequenziare singoli cloni provenienti dalla popolazione virale del paziente (*valutazione delle quasispecie virali*, cioè di varianti genetiche strettamente correlate derivanti dall'evoluzione replicativa del ceppo iniziale).

I test di **caratterizzazione fenotipica** hanno lo scopo di misurare la capacità del virus mutato di replicare in presenza del farmaco e di confrontarla con il virus wild-type. Sono attualmente disponibili diversi test, tra cui quelli più utilizzati si avvalgono essenzialmente di colture cellulari. Il DNA virale, estratto dal siero del paziente, viene "clonato" in una struttura plasmidica e introdotto in cellule epatiche in coltura che, riproducendosi, permettono la moltiplicazione del DNA clonato. Il parametro che viene generalmente considerato è l'IC50, cioe' la concentrazione di farmaco in grado di inibire il 50% della replicazione virale: più è alto questo valore maggiore è la capacità del virus mutato di replicare in presenza del farmaco, ovvero occorrono concentrazioni più elevate di farmaco per ottenere lo stesso grado di inibizione. Uno dei limiti di queste tecniche di fenotipizzazione è stato in passato legato al fatto che utilizzando HBV clonato in un plasmide vengono persi alcuni importanti passaggi del mantenimento dell'infezione virale, come la formazione del cccDNA. Recentemente l'uso di vettori baculovirus modificati permette di ottenere un ciclo replicativo con formazione di cccDNA nelle cellule epatiche trasdotte.

La determinazione dei profili di resistenza dei diversi farmaci e' importante per la valutazione di nuove terapie di combinazione basate su farmaci senza resistenza crociata, al fine di prevenire o ritardare l'insorgenza di virus resistenti. E' noto ad esempio che, con l'eccezione degli analoghi nucleotidici, come ADV e tenofovir, il pattern di mutazioni degli analoghi L-nucleosidici si sovrappone a quello della LAM, suggerendo come la selezione di un mutante LAM-resistente può condizionare le successive scelte del trattamento. I ceppi resistenti ad ADV rimangono viceversa sensibili a LAM, emtricitabina, entecavir e telbivudina.

Attualmente l'analisi dell'insorgenza di resistenza virale viene realizzata per inferenza attraverso la perdita di controllo della soppressione della viremia. La complessità crescente delle terapie disponibili ha ampliato lo spettro di mutazioni farmaco-resistenti ed ha aumentato sensibilmente il rischio di resisten-

ze crociate. Per questo motivo, e per l'importanza che sembra avere l'adattamento precoce della terapia antivirale all'insorgenza di resistenza, è auspicabile che le metodiche per individuare le farmaco-resistenze, come i test di valutazione genotipica, vengano a far parte delle strategie correnti di gestione dell'epatite cronica B, soprattutto in quei pazienti che mostrano una perdita della soppressione della replicazione e sono stati esposti a piu' farmaci anti-HBV.
La frequenza di insorgenza di resistenze varia a seconda dei diversi farmaci: nel caso di LAM si osserva resistenza nel 23%, 46% 55% , 65 e 70% dei pazienti dopo 1, 2, 3, 4 e 5 anni di trattamento; per ADV non si osservano resistenze dopo 1 anno ma queste compaiono successivamente nel 3%, 11%, 19% e 30% dopo 2, 3, 4 e 5 anni di terapia. Entecavir sembra avere il miglio profilo di resistenza in quanto si ha meno dell'1% di resistenze dopo 4 anni. Infine, nel caso della telbivudina si osserva un 25% di resistenze nei pazienti con malattia HBeAg positiva a 2 anni e 12% nei pazienti anti-HBe positivi. Queste frequenze sembrano nettamente inferiori se vengono presi in considerazione i pazienti anti-HBe positivi con viremia non superiore ai 7 Log

Strategie di gestione del paziente con resistenza virale.
La prevenzione dell'insorgenza di farmaco-resistenza si basa su tre principi:
massimizzare l'attività antivirale scegliendo un farmaco intrinsecamente dotato di una potente attivita' antivirale e utilizzando la massima dose tollerata e il regime più efficace per sopprimere i livelli di HBV DNA a valori più bassi possibile;
massimizzare le barriere genetiche alla resistenza sia evitando le terapie sequenziali e le interruzioni di trattamento che scegliendo farmaci mai utilizzati in quel paziente e che richiedono mutazioni multiple per la farmaco-resistenza;
aumentare le barriere farmacologiche, promuovendo la compliance del paziente, aumentando i livelli di "valle" del farmaco (cioè i livelli plasmatici di farmaco minimi tra una dose e l'altra) e migliorando il metabolismo e la farmacocinetica dell'analogo nucleosidico.
L'introduzione sequenziale nel tempo dei diversi farmaci antivirali attivi contro l'HBV ha portato a definire di volta in volta le strategie migliori per la gestione delle resistenze nei pazienti trattati, strategie volte a minimizzare gli effetti clinici negativi dell'insorgenza della resistenza e di mantenere la soppressione completa della replicazione virale a lungo termine. Naturalmente, la maggior parte dei dati disponibili riguarda ancora la LAM-resistenza, che rappresenta ancora il problema clinico di gran lunga piu' frequente. In via di principio vi sono quattro strategie possibili nella gestione del paziente con LAM-resistenza. La prima è quella di *continuare il trattamento con LAM*, al fine di sopprimere ulteriormente la viremia o prevenire la ricomparsa del virus wild-type, che ha una maggiore efficacia replicativa del mutante. È tuttavia elevato il rischio di selezione di mutazioni adattative che compensano per la ridotta efficienza replicativa. Gli studi oggi disponibili sembrano dimostrare che non ci sono benefici nel continuare il trattamento con LAM dopo l'insorgenza di resistenza. L'*interruzione del trattamento* (seconda opzione) sembrerebbe non provocare peggioramenti in termini di incidenza di flare epatitici e scompenso epatico rispetto alla continuazione della terapia nei pazienti con malattia epatica lieve nei quali il trattamento con lamivudina era stato iniziato in assenza di una indicazione forte al trattamento. La terza opzione è quella di *sostituire LAM*, una volta insorta la resistenza, con un nuovo farmaco antivirale. Infine la quarta opzione è quella di aggiungere a LAM un farmaco, antivirale o interferone, efficace in presenza di LAM-resistenza. Gli studi di Lampertico e collaboratori hanno dimostrato coma una strategia di combinazione precoce di LAM-ADV ("*early add on*") all'insorgenza di farmaco-resistenza genotipica rappresenti nei pazienti con LAM-resistenza la migliore scelta terapeutica e garantisce oltre 3 anni di controllo comple-

to della replicazione virale in assenza di nuove resistenze. Nei pazienti con malattia clinicamente piu' avanzata in cui l'eventuale sviluppo di resistenza può associarsi ad un rischio più elevato di peggioramento clinico, viene proposto, sia nelle raccomandazione degli esperti USA che nelle raccomandazioni italiane della Conferenza di Stresa di iniziare una terapia di combinazione gia' nel paziente naive. La sostituzione della lamivudina con entecavir, sia pure piu' potente e ancora capace di sopprimere la replicazione di un mutante LAM-resistente, comporta pero', a causa del parziale overlap delle mutazioni selezionate dai due farmaci, un maggior rischio di sviluppo di resistenza vero entecavir. Quando sara' disponibile il tenofovir sia la sostituzione della lamivudina con tenofovir sia la combinazione lamivudina-tenofovir sono valide opzioni.

Nel caso di resistenza all'adefovir le opzioni possibili sono rappresentate dalla sostituzione con o aggiunta di lamivudina o telbivudina o entecavir o, ancora una volta quando questa opzione sara' disponibile, il passaggio alla combinazione precostituita tenofovir-emtricitabina. I dati relativi alla gestione dela resistenza a entecavir sono estremamente scarsi e l sostituzione o aggiunta di adefovir o tenofovir sembra essere la prima opzione.

In tutti I casi e' importante ricordare che tutte le terapie sequenziali sono a maggior rischio di sviluppo di ceppi mutanti con multiple resistenze.

Recentemente, un workshop NIH principalmente sulla base dell'analisi dei risultati dello studio clinico GLOBE nel quale venivano confrontati il trattamento per 24 mesi con lamividina e con telvibudina, e' stato proposto di considerare come fallimenti terapeutici tutti i pazienti che non raggiungono una riduzione di 1 o 2 Log della viremia entro, rispettivamnete le 12 o le 24 settimane di trattamento. Parimenti, tutti i pazienti che non raggiungono una negativizzazione della viremia entro 24 settimane con farmaci ad alta attivita' antivirale o 48 settimanne nel caso di ADV (meno potente) vanno considerati pazienti con una risposta sub-ottimale e dovrebbero essere presi in considerazione per una modificazione della terapia o per sostituzione dell'antivirale o, meglio, con l'agiunta in combinazione di un secondo antivirale con caratteristiche adatte dal punto di vista del profilo di resistenza. Tale strategia mira a prevenire l'insorgenza di resistenze la cui probabilita' aumenta ogni qual volta la replicazione virale non viene soppressa in modo completo e rapido.

BIBLIOGRAFIA

1. Angus P, Locarnini S. Lamivudine-resistant hepatitis B virus and ongoing lamivudine therapy: stop the merry-go-round, it's time to get off! *Antivir Ther* 2004; 9: 145-8.
2. Angus P, et al. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* 2003; 125: 292-7.
3. Ayres A, et al. Lamivudine and famciclovir resistant hepatitis B virus associated with fatal hepatic failure. *J Clin Virol* 2003; 27: 111-6.
4. Bock CT et al. Selection of hepatitis B virus polymerase mutants with enhanced replication by lamivudine treatment after liver transplatation. *Gatroenterology* 2002; 122: 264-73.
5. Chin R, et al. In vitro susceptibilities of wild-type or drug-resistant hepatitis B virus to (-)-b-D-2,6-diaminopurine dioxalane and 2'-fluoro-5-methyl- b-L-arabinofuranosyluracil. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2495-501.
6. Delaney IV WE et al, Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: current aspects and directions for future investigation. *Antiviral Chem Chemother* 2001; 12: 1-35.
7. Durantel, D., Brunelle, M. N., Gros, E., Carrouee-Durantel, S., Pichoud, C., Villet, S., Trepo, C., and Zoulim, F. (2005). Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. J Clin Virol *34 Suppl 1*, S34-43.

8. Dusheiko, G., and Danta, M. (2007). Telbivudine for the treatment of chronic hepatitis B. Drugs Today (Barc) *43*, 293-304.
9. Ganem D, et al. Hepatitis B virus infection - Natural hystory and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 118-29.
10. Glebe, D. (2007). Recent advances in hepatitis B virus research: a German point of view. World J Gastroenterol *13*, 8-13.
11. Hoofnagle, J. H., Doo, E., Liang, T. J., Fleischer, R., and Lok, A. S. (2007). Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. Hepatology *45*, 1056-1075.
12. Keeffe, E. B., Zeuzem, S., Koff, R. S., Dieterich, D. T., Esteban-Mur, R., Gane, E. J., Jacobson, I. M., Lim, S. G., Naoumov, N., Marcellin, P.*, et al.* (2007). Report of an international workshop: Roadmap for management of patients receiving oral therapy for chronic hepatitis B. Clin Gastroenterol Hepatol *5*, 890-897.
13. Lau GK, et al. Peginterferon alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2682-95.
14. Lampertico P et al. Adefovir rapidly suppresses hepatitis B in HBeAg-negative patients developing genotypic resistance to lamivudine. *Hepatology* 2005; 42: 1414-19.
15. Liaw YF, et al. Non benefit to continue lamivudine therapy after emergence of YMDD mutations. *Antivir Ther* 2004; 9: 257-62.
16. Levine S, et al. Efficacies of entecavir against lamivudine-resistant hepatitis B virus replication and recombinant polymerase in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2525-32.
17. Locarnini S et al. Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antiviral Ther* 2004; 9: 679-93.
18. Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Semin Liver Dis* 2005; 25(Suppl 1): 9-19.
19. Locarnini, S., and Mason, W. S. (2006). Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance. J Hepatol *44*, 422-431.
20. Lok, A. S., Zoulim, F., Locarnini, S., Bartholomeusz, A., Ghany, M. G., Pawlotsky, J. M., Liaw, Y. F., Mizokami, M., and Kuiken, C. (2007). Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. Hepatology *46*, 254-265.
21. Ono-Nita SK et al. Susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to other reverse trancriptase inhibitors. *J Clin Invest* 1999; 103: 1635-40.
22. Sablon E, Shapiro F. Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance. *Int J Med Sci* 2005; 2: 8-16.
23. Shaw T, et al. Rescue therapy for drug resistant hepatitis B: another argument for combination chemotherapy? *Gastroenterology* 2004; 126: 343-8.
24. Suzuki F, et al. Interferon for treatment of breakthrough infection with hepatitis B virus mutants developing during long-term lamivudine therapy. *J Gastroenterol* 2002; 37: 922-7.
25. Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* 2004; 64: 1.15.
26. Zoulim F. Combination of nucleoside analogues in the treatment of chronic hepatitis B virus infection: lesson from experimental models. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 608-11.
27. Zoulim, F. (2006b). Entecavir: a new treatment option for chronic hepatitis B. J Clin Virol *36*, 8-12.
28. Zoulim, F. (2006c). In vitro models for studying hepatitis B virus drug resistance. Semin Liver Dis *26*, 171-180.

DECOMPENSATED LIVER DISEASE AND LIVER TRANSPLANTATION

Mario Angelico
Cattedra di Gastroenterologia Dipartimento di Medicina Interna
Università di Roma Tor Vergata
angelico@med.uniroma2.it

Il trattamento della cirrosi scompensata da HBV ha sempre rappresentato un compito arduo per il clinico epatologo, che tuttavia si è arricchito negli ultimi anni di varie nuove opzioni terapeutiche rivelatesi sul campo, pur in assenza o quasi di studi clinici controllati, di grande efficacia. Secondo le linee guida più recenti il trattamento della cirrosi HBV-relata in fase di scompenso deve essere tempestivo ed orientato a ricompensare il più rapidamente il paziente per evitare l'insorgenza di complicanze mortali e, se il paziente è candidabile al trapianto, a rendere possibile questo percorso.
Le più recenti linee guida dell'AASLD prevedono specificamente che :

- i pazienti con cirrosi scompensata da HBV che sono candidabili al trapianto di fegato debbano essere considerati per il trattamento antivirale in modo coordinato con il centro trapianti (evidenza II-3)
- l'interferone-alfa non sia utilizzato per il conseguente rischio di aggravamento clinico della malattia epatica (evidenza II-3)
- ll management post-trapianto del paziente trapiantato per malattia HBV-relata includa sempre una forma di terapia/profilassi antivirale (evidenza II-3)

A lungo si è dibattuto tra gli esperti circa il cut-off ideale di HBV-DNA da utilizzare per il intraprendere un trattamento antivirale nella cirrosi HBV-relata, ritenendosi dai più che esso debba essere intrapreso a valori più bassi di viremia di quanto si faccia nel paziente non cirrotico, sia per i pazienti HBeAg positivi che negativi. In accordo con questa linea di pensiero, mentre il trattamento dell'epatite cronica con evidenza istologica e biochimica di malattia viene usualmente iniziato con valori di HBV DNA $\geq 10^5$ copie/ml (20000 UI/ml), tale valore viene ridotto a 10^4 copie/ml (2000 UI/ml) nei pazienti con cirrosi epatica. Secondo il consenso italiano raggiunto nella recente Conferenza di Stresa il trattamento antivirale nei pazienti con cirrosi scompensata dovrebbe essere iniziato per qualunque valore di viremia misurabile, nel convincimento che questi pazienti rischino troppo nel mantenere anche una minima persistenza di virus circolante. Il trattamento deve essere preferibilmente iniziato, sin dall'inizio, con la combinazione lamivudina + adefovir dipivoxil, o comunque con lamivudina seguita dall' *"early add on"* di adefovir, specialmente in assenza di una iniziale risposta insufficiente alla sola lamivudina. Tale approccio consente, in una considerevole percentuale di pazienti scompensati, di ottenere un miglioramento del punteggio di Child-Turcotte- Pugh, o dello score MELD, sino ad ottenersi eventualmente il ritorno in uno stadio di compenso clinico. Non è infatti infrequente che pazienti inizialmente riferiti per il trapianto di fegato, o già inscritti in lista di trapianto, vengano successivamente sospesi o addirittura rimossi dalla lista per manifesto stabile miglioramento. In tali circostanze occorre certamente molta prudenza prima di decidere una eventuale sospensione permanente di un paziente dalla lista trapianto, considerato il rischio di emergenza di resistenza virologica (e del connesso peggioramento clinico) o di insorgenza di epaticarcinoma (il cui rischio è solo modestamente ridotto da una efficace azione antivirale). Resta comunque il fatto che in un apprezzabile numero di pazienti l'indicazione al trapianto può essere posticipata, magari di alcuni anni. Diventa cruciale in questo contesto utilizzare per il mantenimento a lungo termine farmaci a minor rischio di perdere di efficacia per lo sviluppo di farmaco-resistenza. E' quindi intuitivo che tali pazienti dovrebbero essere preferibilmente trattati in centri di epatologia collegati a

laboratori di virologia capaci di effettuare tale tipo di analisi.
Mentre l'utilizzo di interferone-alfa o di peginterferone-alfa è controindicato nel cirrotico scompensato (per la improbabile efficacia ed il rischio di ulteriore deterioramento clinico), la recente disponibilità di nuovi farmaci analoghi nucleosidici (oggi l'entecavir e la telbivudina, prossimamente anche il tenofovir) apre nuove opportunità per il trattamento del paziente cirrotico scompensato. Tali possibilità tuttavia necessitano ancora di essere formalmente esplorate. E' plausibile in ogni caso ipotizzare che l'utilizzo di farmaci più potenti e caratterizzati da una più alta barriera genetica possa risultare particolarmente vantaggiosa nel difficile contesto clinico del pazienti cirrotico scompensato per malattia HBV-relata, dove una maggiore rapidità d'azione ed un minor rischio di resistenza è particolarmente prezioso per assicurare una efficacia più durevole in assenza di resistenze fenotipiche e genotipiche.

L'utilizzo di antivirali potenti e con alta barriera genetica potrebbe modificare profondamente anche l'attuale approccio sia 1) nella preparazione del paziente al trapianto di fegato che 2) nella sua gestione clinica dopo il trapianto. Relativamente al primo punto, come è noto i migliori risultati di *outcome* del trapianto si ottengono quando il paziente viene trapiantato in assenza di viremia HBV misurabile utilizzando una PCR sensibile, in quanto ciò riduce sensibilmente il rischio di recidiva precoce ed anche la quantità di HBIg inizialmente necessarie. Quanto al secondo punto, è noto che la profilassi della recidiva di infezione HBV nel post-trapianto si basa oggi sull'uso indefinito di immunoglobuline specifiche anti-HBs (HBIg), generalmente associate alla lamivudina. Tale approccio comporta costi elevatissimi e non è scevro da rischi, né da disagi per il paziente. Attualmente sono in corso studi clinici volti a verificare se l'uso dei nuovi analoghi possa rappresentare una valida e vantaggiosa alternativa in questo contesto. Sono altresì in corso studi volti a valutare nuove schedule di utilizzo di HBIg, da sole od in combinazione con analoghi nucleosidici/nucleotidici, e nuove schedule vaccinali, capaci di assicurare risultati miglior di quelli, generalmente modesti, che si sono ottenuti con il vaccino convenzionale con HBsAg ricombinante. Un recente studio ha dimostrato che l'utilizzo di un nuovo vaccino anti-HBV associato al neoadiuvante MPL potrebbe dare risultati di interesse clinico in tale ambito.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Halting the natural history of hepatitis B viral infection: a paradigm shift. **Perrillo RP**, **Jacobson IM**. **Semin Liver Dis.** 2007 Aug;27 Suppl 1:3-8
2. Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. **Hoofnagle JH**, **Doo E**, **Liang TJ**, **Fleischer R**, **Lok AS**. **Hepatology.** 2007 Apr;45(4):1056-75.
3. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. **Lok AS**, **Zoulim F**, **Locarnini S**, **Bartholomeusz A**, **Ghany MG**, **Pawlotsky JM**, **Liaw YF**, **Mizokami M**, **Kuiken C**; **Hepatitis B Virus Drug Resistance Working Group**. **Hepatology.** 2007 Jul;46(1):254-65

PROPHYLAXIS IN ONCO-HAEMATOLOGY

Alfredo Marzano
Divisione di Gastroenterologia ed Epatologia
AOU San Giovanni Battista di Torino

1. Introduzione

Le indicazioni alla profilassi dell'epatite B in ambito onco-ematologico riportate fanno riferimento a 3 eventi (I Single Topic AISF, Torino 2005; Update, Torino 2007 e Consensus Nazionale Epatite B, Stresa 2007) organizzati dall'AISF in associazione con le diverse società scientifiche coinvolte. Tutti gli eventi hanno prodotto indicazioni riferite al Grado ed alla Forza delle evidenze disponibili.

2. Definizioni.

L'infezione cronica da virus dell'epatite B è stata associata a varie condizioni, in accordo con la letteratura internazionale:

A) **portatore cronico attivo ed inattivo** del virus epatitico B (HBV), nei carriers conclamati (HBsAg-positivi; B) **portatore occulto (potenziale o conclamato)** nei soggetti HBsAg-negativi, portatori o meno di marcatori di pregresso contatto con HBV (antiHBc±antiHBs) con evidenza di HBV DNA determinabile nel fegato e/o nel siero.

In questa ultima condizione l'ovvia difficoltà di determinazione dell'HBV DNA intraepatico ha indotto a considerare, in ambito clinico, la presenza dei marcatori di pregresso contatto (in particolare l'antiHBc -**anti-core**- come un marcatore surrogato associato alla possibile presenza dell'HBV nel fegato. **Tabella 1.**

Virological categories

	Active carrier	Inactive carrier	AntiHBc-positive (anti-core)
HBsAg	Positive	Positive	Negative
HBeAg	Positive or negative	Negative	Negative
AntiHBs	Negative	Negative	Positive or negative
AntiHBc	Positive	Positive	Positive
HBV DNA serum	≥20,000–2000[a] IU/mL	<20,000 IU/mL	Negative (>90%)
ALT[b]	Persistently or intermittently increased	Persistently normal[c]	Persistently normal[c]
HBV DNA tissue	Positive	Positive	Positive
Liver damage[d]	Yes (>90%)	No (>90%)[b]	No[b]

[a] In antiHBe-positive patients.
[b] ALT.
[c] In the absence of other causes of chronic hepatitis and/or of a previous history of chronic hepatitis B.
[d] Necroinflammatory score >4 HAI.

La strategia di trattamento è stata definita ***terapia*** in caso di <u>epatite</u> (caratterizzata dalla presenza di livelli viremici definiti significativa – HBV DNA ³ 20,000 UI - e alterazione degli indici di flogosi) e ***profilassi*** in presenza di <u>soli marcatori d'infezione</u> (HBV DNA e/o HBsAg) in assenza di epatite conclamata. Infine la profilassi è stata definita *universale* quando indirizzata all'intera popolazione a rischio e *mirata* nel caso in cui venga limitata ad un gruppo particolare e/o subordinata alla comparsa di marcatori d'infezione. Nei soggetti anti-core l'evento virologico significativo (comparsa HBsAg) è stato definito ***sero-reversione,*** in quanto costantemente associato alla ripresa epatitica.

La definizione diagnostica basale (**baseline**) viene considerata indispensabile. **Tabella 2.**

Baseline assessment

Level 1	Level 2			Level 3
	Patients with altered transaminases	Patients HBsAg-positive	Patients anti-core positive	Patients HBV DNA-positive and/or with chronic hepatitis
Transaminase, gamma-glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase	Ultrasonography	HDV	AntiHBe	IgM antiHBc (IMx index)
Haemochrome	Glycemia	HBeAg, antiHBe	HBV DNA	Liver biopsy assessment
Total and fractionated bilirubin	Cholesterol and triglycerides	HBV DNA		
AntiHCV	Prothrombin time			
HBsAg, antiHBs titre, antiHBc	Ferritin			

3. Opzioni terapeutiche e monitoraggio.
Nel corso degli eventi 2005 e 2007 sono state dibattute le diverse opzioni alla luce del progressivo sviluppo dell'armamentario terapeutico.
Nell'ambito onco-ematologico il ruolo degli interferoni appare limitato, per la scarsa tolleranza e la frequente coesistenza di condizioni limitanti. Gli analoghi nucleos(t)idici (AN), invece costituiscono un valido presidio, sia nella condizione di profilassi che di terapia.
Lamivudina (registrato per HBV): pur se limitate, le maggiori esperienze cliniche pubblicate risultano riferite a questo farmaco, di cui è nota l'efficacia antivirale e il basso costo, ma anche la bassa barriera genetica, con percentuali di farmaco-resistenza sino al 50-60% a 4 anni, in condizione d'immunocompetenza, sino all'80% nei pazienti immunodepressi (ad esempio con confezione HIV).
Adefovir (registrato per HBV): riguardo questo farmaco esistono segnalazioni episodiche d'utilizzo. Alla luce delle più recenti indicazioni derivate dall'esperienza negli immunocompetenti il farmaco costituisce, anche negli immunodepressi, un valido strumento di controllo della lamivudina-resistenza, in associazione alla lamivudina ed in corso di strategia di aggiunta (add-on) precoce, al momento del primo rilievo di resistenza in corso di monitoraggio.
La classe di appartenenza (analogo nucleotidico) lo indica, inoltre, come farmaco ottimale d'associazione ad un analogo nucleosidico in caso di profilassi o terapia combinata ab-initio, o dopo una iniziale fase di monitoraggio e selezione di soggetti con risposta subottimale.
Entecavir (registrato per HBV): riguardo a questo farmaco non risultano disponibili esperienze nell'ambito dell'immunodepressione, ma l'elevata potenza antivirale e l'alta barriera genetica nei soggetti naive, permette d'ipotizzarne un promettente utilizzo anche nell'ambito dell'immunodepressione.
Telbivudina (registrato per HBV): anche in questo caso non esistono esperienze, ma la classe d'appartenenza (analogo nucleosidico) ed il profilo di potenza antivirale ne prospettano un possibile impiego, specie nelle condizioni di elevate cariche virali (caratteristiche della condizione d'immunodepressione) e nelle combinazioni con analoghi nucleotidici.
Tenofovir, emctricitabina (registrati per HIV): il profilo antivirale e di resistenza di questi farmaci deriva dall'esperienza nei pazienti con confezione HIV, sia in monoterapia (tenofovir) che in combinazione. In particolare il primo, un analogo nucleotidico, presenta caratteristiche di potenza ed elevata barriera genetica che ne prospettano un potenziale utilizzo anche nell'ambito dell'immunodepressione. Dalla scarna letteratura disponibile, in condizioni particolari di lamivudina-resistenza e successiva resistenza all'adefovir, conseguenti a multiterapie sequenziali, il tenofovir costituisce ad oggi l'unico strumento terapeutico di controllo, in combinazione con un analogo nucleosidico. Il dato assume particolare importanza nella condizione d'immunodepressione.
Monitoraggio: in tutte le condizioni di trattamento con AN è stata proposta come criterio di risposta la completa negativizzazione dell'HBV DNA determinato con tecnica amplificata (< 2-3 logaritmi). La tempistica di monitoraggio è stata definita in 3 mesi, riservando il monitoraggio serrato (ogni mese) alle condizioni di massiva immunodepressione, ad esempio in corso di terapie ematologiche di particolare impatto. La resistenza ai farmaci è stata subordinata alla ripresa virologica (incremento della viremia di almeno 1 logaritmo rispetto il nadir, determinato in 2 controlli consecutivi). In questo caso la conferma tramite determinazione genotipica può indirizzare la scelta terapeutica.

4. Onco-ematologia.
In corso di chemioterapia l'epatite B può manifestarsi in due fasi diverse, **durante il trattamento** (in relazione all'intensa soppressione immunologica, cui si associa una forte replicazione virale e, talvolta, la

comparsa di epatite fulminante in forma fibrosante colestatica), oppure **dopo la fine della terapia**, in quanto nella fase d'immuno-ricostituzione la risposta immune può indurre una riattivazione epatitica, a decorso più o meno grave, a seconda della condizione basale del fegato (baseline) e di possibili concause di danno.
In oncologia la prevalenza di soggetti HBsAg-positivi varia tra il 5.3% (in Europa) ed il 12% (in Cina). In questi pazienti la frequenza di riacutizzazioni oscilla tra il 20 ed il 56% ed è correlato all'uso di steroidi, antracicline e 5-fluorouracile. Nei **portatori conclamati** la riattivazione è più frequente quando sono presenti alcuni indicatori virologici (presenza di HBeAg o di varianti e-minus e/o di HBV DNA pre-terapia). La significatività clinica della riacutizzazione è chiaramente associata alla funzione epatica pre-chemioterapia, ad ulteriore conferma della necessità di stadiazione basale dell'epatopatia e la mortalità può variare dal 5 al 40%. La riacutizzazione epatitica, inoltre, influenza il proseguimento della chemioterapia, inducendone la sospensione e ponendo non infrequentemente problemi di diagnostica differenziale rispetto alla tossicità da farmaci. L'evento può manifestarsi sia nei portatori conclamati, sia nei portatori inattivi ed è preceduto, in genere, dalla ripresa viremica nelle 2-3 settimane antecedenti.
In **ematologia** la prevalenza di portatori conclamati (HBsAg-positivi) appare superiore ad altri ambiti (12.2% in Grecia e 8.8% in un recente studio italiano) e la frequenza di riacutizzazione maggiore rispetto ad altri ambiti oncologici, in relazione all'entità dell'immunosoppressione. In questo ambito i principali indicatori prognostici sfavorevolmente associati alla ripresa epatitica B sono risultati, oltre a quelli già citati, il sesso maschile, l'età giovanile, l'ipertransaminasemia e la condizione di secondo o terzo ciclo chemioterapiaco rispetto al primo.
In campo ematologico il rischio di riacutizzazione risulta del 21-67% (mediana 50%), con una mortalità media del 20%. L'entità del rischio in relazione alla condizione di portatore attivo o inattivo non è chiaramente determinabile dalla letteratura disponibile, così come la possibile compartecipazione di altre condizioni patologiche (VOD, GvHD o MOF).
In particolare in ambito ematologico, ma non solo, il rischio parrebbe incrementato dall'uso di anticorpi monoclonali (antiCD20, antiCD52), con possibilità di riacutizzazione epatitica (anche dopo un ciclo di 1-3 mesi di profilassi con lamivudina) a distanza di 12-36 mesi dall'ultima somministrazione del monoclonale, in particolare nei portatori attivi, ma anche nei soggetti anti-core. Un analogo rischio va considerato in corso di trapianto di midollo osseo allogenico (HSCT), in quanto l'effetto immuno-soppressivo in fase di condizionamento è particolarmente forte ed è amplificato dalla successiva terapia antirigetto, per cui la possibilità di riacutizzazione epatitica permane per tutta la fase di immunoricostituzione (in alcuni casi fino a 1-2 anni dal trapianto). Nel corso dell'evento 2007 è stato, inoltre, segnalato dagli ematologi un possibile aumento del rischio in corso di Leucemia linfatica cronica o mieloma, in relazione al particolare effetto immunosoppressivo.

5. Esperienze nelle varie categorie virologiche.

5.1 **Portatore attivo.** In ambito onco-ematologico la terapia con lamivudina delle forme attive appare efficace, mentre l'inizio della terapia antivirale all'insorgenza di manifestazioni cliniche mantiene una mortalità residua del 20%, probabilmente in relazione alle condizioni basali ed alla latenza di trattamento. In un recente studio asiatico l'epatite B si è manifestata in percentuale significativamente inferiore in corso di trattamento con lamivudina rispetto ad un controllo storico (17.5% vs 51.7%, p=0.0001), mentre il guadagno in termini di sopravvivenza (100 vs. 94.8%) non ha raggiunto la significatività statistica. Da segnalare, nel gruppo trattato con lamivudina, la ripresa epatitica conseguente alla selezione del mutante lamivudina-resistente 9.2 mesi dopo l'inizio della tera-

pia, a conferma della necessità di un attento monitoraggio virologico. Una significativa selezione di resistenza alla lamivudina (determinata a livello genotipico nel 63% dei pazienti con una mediana di trattamento di 73 settimane- range19/153 settimane-) è stata descritta in un secondo studio su casistica asiatica.

5.2 **Portatore inattivo.** In studi retrospettivi la lamivudina si è dimostrata efficace nella profilassi della riacutizzazione epatitica (0-9% rispetto al 25-85% dei non trattati) e nell'unico studio prospettico l'epatite si è manifestata nel 5% dei trattati e nel 24% dei controlli. L'utilizzo universale della profilassi è risultato, inoltre, superiore alla strategia mirata (attivata solo alla comparsa di HBV DNA determinato con tecnica non amplificata –ibridizzazione- in corso di monitoraggio bisettimanale), sia in termini di sopravvivenza che di riacutizzazione epatitica (0% vs.53%, P=0.002).

5.3 **Pazienti anti-core** (HBsAg-negativi). I dati di prevalenza ed impatto clinico riferiti ai portatori occulti sono riferiti, principalmente, alla recente revisione pubblicata da Raimondo e collaboratori. Non esistono, al momento, dati relativi all'ambito oncologico riferiti a questa categoria virologica (in cui la presenza di anti-core può raggiungere il 20-40% nelle aree a media endemia ed il 70-80% in aree ad alta endemia). In ambito ematologico, invece, su un totale di 176 pazienti anti-core descritti in letteratura, la sieroconversione è stata riscontrata in 21 soggetti (12%) in corso di chemioterapia convenzionale, associata o meno al trapianto, con percentuali del 4-30% durante la chemioterapia e del 14-50% in corso di autotrapianto. In corso di autotrapianto l'epatite B si è manifestata a maggiore distanza dall'intervento (6-52 mesi, mediana 19 mesi), rispetto ai portatori conclamati (mediana 2-3 mesi) e nessuno dei pazienti descritti è deceduto per l'epatite B (in 7 casi in corso di terapia con lamivudina al momento della riacutizzazione). Di questi pazienti, 9 sono rimasti HBsAg postivi durante il follow up, mentre gli altri casi hanno nuovamente perso il marcatore .

A seguito di allotrapianto, invece, sono noti in letteratura 2 decessi su 39 soggetti con sieroconversione e la stessa è apparsa significativamente associata all'uso di steroidi, all'assenza di anticorpi protettivi (antiHBs) nel donatore ed al quadro di Graft versus Host Disease (GvHD).

La recente introduzione di anticorpi monoclonali anti-linfociti B e T (anti-CD20 e antiCD52), usati da soli o in associazione alla chemioterapia, ha portato alla segnalazione di 6 casi di siero-conversione in soggetti anti-core, in 3 dei quali si è avuta l'insorgenza di una forma fulminante mortale, nonostante la terapia con lamivudina attivata al momento dell'evento.

6. Indicazioni.

6.1 **Lo screening in ambito ematologico viene consigliato in tutti i pazienti; in ambito oncologico, invece, nei soli pazienti per i quali si prospetti una sopravvivenza superiore ai 9 mesi.**

6.1 **Nel portatore attivo si ritiene utile la terapia con NUC in ambito onco-ematologico**, finalizzata al controllo della malattia pre- e post-terapie. Nel trapianto di midollo, in particolare, il controllo della malattia da HBV permette una diagnosi più precisa e la terapia delle complicanze epatiche specifiche (GVHD e VOD) (AIII). In questi pazienti la teapia andrebbe continuata a tempo indeterminato (in relazione al rischio elevato di ripresa epatitica conseguente alla sospensione) o, almeno, sino alla perdita dell'HBsAg. Si consiglia uno stretto monitoraggio dei mutanti farmaco-resistenti, allo scopo di prevenire la ripresa epatitica tramite una terapia di salvataggio (AVI).

6.2 **Nel portatore inattivo, invece, appare indicata la profilassi universale** in ambito onco-ematologico (AIII), da proseguire per tutta la fase di terapia, sino ad almeno 12-18 mesi (in ematologia), 6-12 mesi (in oncologia) dalla fine della chemioterapia e/o immuno-ricostituzione (BVI) (13). La durata della profilassi rimane, però, ancora dibattuta e richiede studi prospettici, in relazione alla

recente segnalazione di riacutizzazioni mortali conseguenti alla sospensione della profilassi con lamivudina. In ogni caso viene raccomandato il monitoraggio della viremia dopo la sospensione, per la pronta diagnosi e l'eventuale ripresa del trattamento in caso di riacutizzazione .

6.3 Nei soggetti anti-core (HBsAg-negativi), potenziali portatori occulti, possono essere identificate due strategie:

A) in campo oncologico, oppure in corso di terapie ematologiche giudicate a basso rischio (ad esempio lo schema ABVD dello schema CHOP 21 giorni) , si consiglia il **monitoraggio dell'HBsAg mono** (in fase di massiva immunodepressione)-**trimestrale** e l'attivazione della profilassi mirata o della terapia in caso, rispettivamente, di sieroreversione (comparsa di positività per HBsAg in un soggetto originariamente HBsAg-negativo) e/o di riacutizzazione epatitica (BVI). Invece l'utilizzo del monitoraggio dell'HBV DNA, determinato con tecniche amplificate, rimane dibattuto per i costi, la durata e le difficoltà interpretative (CV);

B) nel solo ambito ematologico e nel caso in cui si prospetti un'intensa immunosoppressione (chemioterapia con fludarabina, regimi dose-sense, trapianto allogenico, trapianto autologo mieloablativo, induzione delle leucemie acute, utilizzo di ripetuti cicli con monoclonali) si propone una profilassi universale, specie nei soggetti con segni d'epatopatia cronica e/o positivi per l'HBV DNA serico e/o per gli anticorpi antiHBe al baseline (BVI). Nell'ambito specifico dei soggetti anti-core si conferma la necessità di registri e di studi, sia osservazionali che prospettici.

Di seguito si riportano le raccomandazioni proposte durante la Consensus di Stresa per la scelta dei NUC nella condizione d'immunodepressione.

- **Terapia (PCA):** scelta del farmaco in analogia all'immunocompetente con raccomandazione all'utilizzo di farmaci ad alta barriera genetica ed elevata potenza. Nell'immunocompromesso prendere in considerazione la combinazione ab-initio o l'aggiunta a 6-12 mesi di un secondo farmaco efficace in caso di risposta parziale. (CIII)

- **Profilassi in PCI (HBV DNA < 2000 UI, mai trattati con NUC)** da considerare farmaci ad elevata barriera genetica (BIII). In paziente con anamnesi di pregresso trattamento con NUC utilizzare lo stesse precauzioni consigliate in terapia.

- **Profilassi in anti-core.** In relazione al minimo rischio di resistenza in corso di trattamento si ritiene utile NUC a basso costo, indipendentemente dalla barriera genetica (CIII).

7. Trapianto di midollo da donatori HBsAg-positivi.

Il trapianto da donatore HBsAg-positivo si associa ad un'epatite nel 44-62% dei riceventi con mortalità nel 33-75 % dei casi, anche se il ruolo preciso dell'infezione da HBV nel determinare tali eventi non è determinabile con chiarezza dai pochi studi disponibili. In uno studio storico, in fase pre-antivirali, le immunoglobuline specifiche (HBIG) non sono risultate protettive sulla trasmissione dell'infezione; in contrasto la terapia nel donatore con lamivudina e la profilassi nel ricevente con lo stesso antivirale ha ridotto significativamente la frequenza di epatite acuta (48% vs 7%, P=0.002) e la mortalità (24% vs 0%, P=0.01) correlate all'HBV, rispetto al gruppo di controllo storico.

In relazione alle attuali terapie disponibili si ritiene indicato l'utilizzo di donatori consanguinei HBsAg-positivi previo trattamento del donatore con NUC (AV), somministrazione nel peri-operatorio di un bolo endovenoso di immunoglobuline specifiche anti-HBs (HBIG) (CVI) e profilassi del ricevente con NUC (AIV).

BIBLIOGRAFIA

1. Marzano A, Angelucci E, Andreone P, Brunetto M, Bruno R, Burra P, Caraceni P, Daniele B, Di Marco V, Fabrizi F, Fagiuoli S, Grossi P, Lampertico P, Meliconi R, Mangia A, Puoti M, Raimondo G, Smedile A; for the Italian Association for the Study of the Liver. Prophylaxis and treatment of hepatitis B in immunocompromised patients. Dig Liver Dis. 2007;39(5):397-408.

Coinfezione HIV-HBV

Massimo Puoti
Clinica di Malattie Infettive e Tropicali, Università degli Studi di Brescia

Introduzione

Si stima che la coinfezione HIV-HBV colpisce 2-4 milioni di persone nel mondo e circa 10.000 in Italia. Con una prevalenza dell' 8-10% tra le persone con infezione da HIV. La coinfezione da HBV è la causa del 3% della mortalità nelle persone che vivono con l'infezione da HIV nei paesi sviluppati. Infatti la coinfezione da HIV determina un aumento dell'incidenza di cronicizzazione dell' infezione acuta da HBV, un decremento dell' incidenza di guarigione spontanea dell'infezione cronica ed accelera la progressione della malattia da HIV verso la cirrosi e l'epatocarcinoma. Inoltre la presenza di infezione da HBV è associata ad una più elevata frequenza di epatotossicità dei farmaci antiretrovirali.
Per questo motivo la diagnosi ed il trattamento della coinfezione da HBV hanno un ruolo fondamentale nella gestione del paziente con coinfezione HIV-HBV

Gestione diagnostica della coinfezione HIV-HBV

Per quanto riguarda la diagnosi tutti i pazienti HIV positivi dovrebbero essere sottoposti a periodico screening per HBsAg e per anti HBc ed anti HBs. Tutti i soggetti negativi per i tre "*markers*" dovrebbero essere vaccinati con vaccino anti HBV. Nei soggetti con CD4 < 200 il ciclo vaccinale dovrebbe essere iniziato non appena raggiunta una conta di linfociti CD4 > 350/μL.
Nei pazienti HBsAg positivi dovrebbe essere ricercata la reattività per HBeAg, anti HBe, HBVDNA, anti HBcIgM, anti HDV ed anti HDV IgM. Questi esami dovrebbero essere ripetuti periodicamente così come una minimale valutazione dei parametri di "funzione epatica" ovvero di ALT,AST, ALP, GGT, PT, Emocromo + Formula, Protidemia ed elettroforesi, bilirubina totale e frazionata. Nei pazienti con età superiore a 45 anni, o provenienti da zone endemiche per HBV o con epatite cronica B dovrebbe essere eseguita ogni 6 mesi un'ecografia epatica finalizzata ad individuare precocemente le lesioni sospette per "epatocarcinoma".

Gestione terapeutica della coinfezione HIV-HBV

Obiettivi del trattamento e risorse disponibili

L'interferone alfa, l'interferone alfa peghilato, la lamivudina, l'entecavir, l'adefovir e la telbivudina sono i farmaci registrati per il trattamento dell'epatite cronica B Il Tenofovir e l'emtricitabina sono farmaci registrati per il trattamento dell'infezione da HIV ed hanno un'attività anti HBV.
L'obiettivo ottimale del trattamento dell'epatite cronica da HBV è di ottenere la "clearance" dell' HBeAg e dell' HBsAg ed anche la sieroconversione anti-HBs. Purtroppo è possibile ottenere questo obiettivo solo in una minoranza di pazienti. Un obiettivo sicuramente più realistico è quello di sopprimere nel lungo periodo la replicazione di HBV riducendo così l'attività necroinfiammatoria epatica ed arrestare o rallentare la progressione della fibrosi. Nella gestione del paziente con coinfezione HIV/HBV entra una variabile che occupa un posto prioritario: non è possibile esporre i pazienti a farmaci attivi sull' HIV al di fuori di una terapia antiretrovirale di combinazione efficace. Per questo motivo gli unici farmaci da impiegare

Resistenza ai farmaci anti HBV

Il principale ostacolo al conseguimento di questo obiettivo è la comparsa di resistenza virale che insorge nell' 80% dei pazienti HIV positivi esposti per 4 anni alla sola Lamivudina come unico farmaco attivo

sull' HBV.
Le conseguenze cliniche della comparsa di resistenza ai farmaci antivirali sono le seguenti:
1) Perdita del beneficio clinico indotto dai farmaci antivirali:
2) Diminuzione delle possibili future opzioni terapeutiche per la presenza di mutazioni associate a resistenza crociata ad altri antivirali
3) Potenziale impatto sulla sanità pubblica
   a) Trasmissione di ceppi virali farmacoresistenti
   b) Mutazioni della sequenza aminoacidica dell' HBsAg (che è codificata dalla regione del genoma che codifica anche per la DNA polimerasi) che potenzialmente possono dare esito alla comparsa di ceppi virali non neutralizzati dagli anticorpi indotti dal vaccino ricombinante

in pazienti che non assumono una cART efficace sono l'Adefovir e la Telbivudina
Indicazioni al trattamento
Gli algoritmi di trattamento dell'infezione da HBV nei pazienti anti HIV+ partono dalla considerazione nel singolo paziente di 4 caratteristiche:
1) lo stadio di malattia epatica,
2) l'indicazione a terapia antiretrovirale ed il numero di CD4,
3) livelli di aminotrasferasi ed
4) i livelli di HBVDNA.

Il trattamento anti HBV va preso in considerazione nei pazienti con ipertransaminasemia e livelli di HBVDNA > 20.000 IU/mL se HBeAg positivi o a 2000 UI/mL se HBeAg negativi.. Il trattamento è indicato nei pazienti con stadio di malattia avanzata e con livelli di HBVDNA superiori a limiti precdentemente esposti indipendentemente dai livelli di aminotrasferasi e nei pazienti con cirrosi epatica in presenza di viremia dosabile indipendentemente dalla sua quantificazione.
Nei pazienti senza indicazione alla terapia antiretrovirale trova spazio l'interferone ed in questa categoria gli antivirali (ovvero la terapia con adefovir e/o telbivudina) trovano spazio solo nei pazienti con malattia avanzata.
Nei pazienti con CD4 < 500 e/o con indicazione a terapia antiretrovirale la terapia anti HBV può essere considerata anche in fasi meno avanzate di malattia e deve essere condotta con la combinazione di un nucleotidico (Tenofovir od Adefovir) ed un nucleosidico (Lamivudina o Emtricitabina o Telbuvudina o Entecavir). Vanno evitate le monoterapie con Lamivudina ed Emtricitabina per l'elevato rischio di resistenza. Prima di sospendere i farmaci ad attività anti HBV cambiando regime di terapia antivirale occorre considerare lo stadio di malattia epatica (evitando assolutamente la sospensione della terapia anti HBV nei soggetti con malattia epatica avanzata) e comunque una volta sospesi occorre controllare in maniera intensiva i parametri di danno epatico nei 6 mesi successivi.
Una sintesi dell'algoritmo sull'indicazione al trattamento anti HBV e riportata in figura 1.
Durante la terapia anti HBV occorre controllare l'andamento dei livelli di HBVDNA.Oltre che per problemi di tossicità o per necessità imposte dalla prescrizione della terapia anti HIV più efficace, la terapia anti HBV condotta con analoghi nucleosidico/nucleotidici va modificata in presenza di una delle seguenti circostanze
   a. "*primary antiviral treatment failure*" (decremento dei livelli di HBVDNA inferiore a un logaritmo dopo 3 mesi di terapia)
   b. risposta terapeutica "subottimale" definita come HBVDNA dosabile e superiore a 1000 cp/mL:
      i. dopo 24 settimane di esposizione a terapie che includono come unico farmaco anti HBV un farmaco a bassa barriera genetica ovvero Telbivudina o Lamivudina o Emtricitabina

ii. dopo 48 settimane di esposizione a terapie che includono come unico farmaco anti HBV un farmaco ad alta barriera genetica ovvero Entecavir, od Adefovir o Tenofovir)

c. *"Breakthrough"* virologico ovvero incremento dei livelli di HBVDNA di almeno 1 logaritmo rispetto al nadir di viremia osservato durante il trattamento

Nel cambiare la terapia con analoghi occorre tenere presente 4 variabili:

1) *il genotipo HBV* e la presenza di mutazioni associate a decremento dell'IC50 dei farmaci anti HBV
2) *la precedente esposizione a farmaci anti HBV.*
3) *I livelli di HBVDNA* tenendo presente che in presenza di livelli elevati farmaci poco potenti (come l'adefovir) non consentono risposte ottimali e farmaci con bassa barriera genetica (come la telbivudina o l'entecavir in soggetti già esposti a lamivudina) possono indurre più facilmente resistenza
4) Che occorre *aggiungere un nucleotidico ad* una terapia inefficace con *un nucleosidico* e *viceversa*
5) Che i farmaci che possono compensare riduzioni dell' IC50 inferiori a 10 volte con le loro elevate concentrazioni intracellulare sono l'entecavir ed il tenofovir

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Rockstroh J et al. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of chronic hepatitis B and C coinfection in HIVinfected adults HIV medicine 2008 in press
- Soriano V et al Care of HIV-infected patients with chronic hepatitis B: Updated recommendations from the HIV-HBV International Panel AIDS 2008 in press
- Keeffe E. Report of an International Workshop: Roadmap for Management of Patients Receiving Oral Therapy for Chronic Hepatitis B Clin Gastr Hepatol 2007;5:890–897

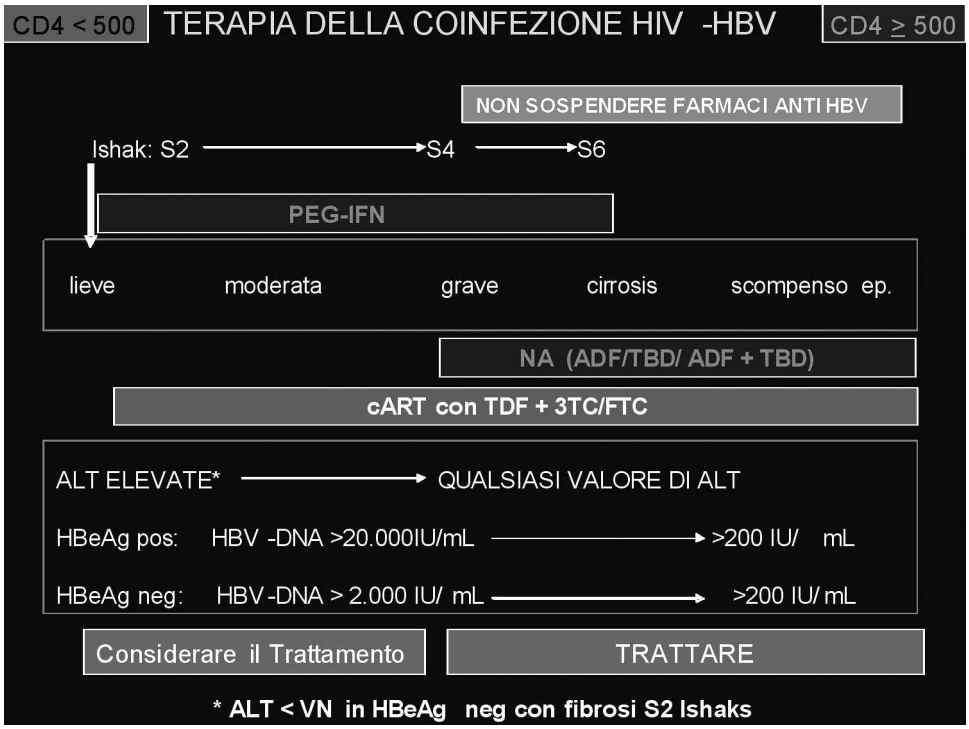



Figura 1
Sintesi delle indicazioni alla terapia anti HBV nel paziente con coinfezione HIV-HBV