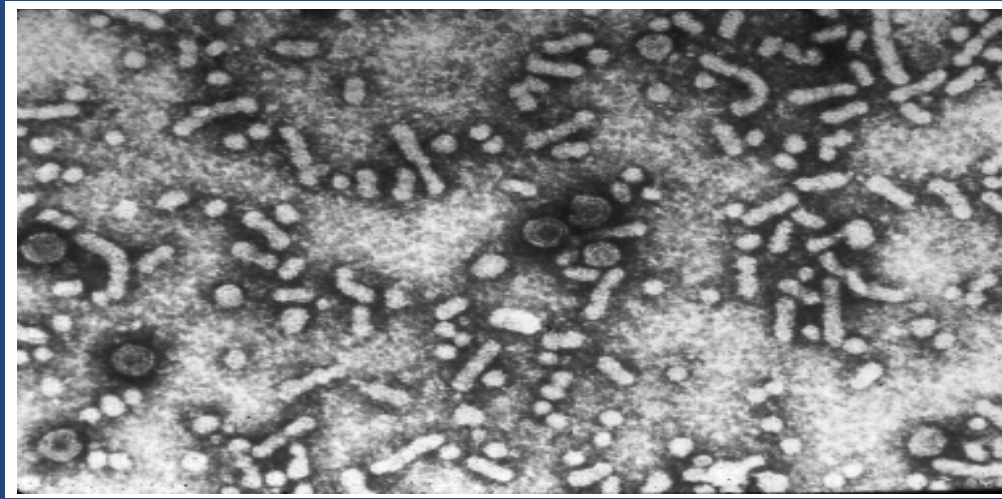


Infezione occulta da HBV



G. Cambié

Roma, 16 marzo 2011

Infezione HBV

Storia naturale

Malattia acuta

Guarigione clinica

Risoluzione dell'infezione (non danno epatico, non viremia)

Sieroconversione HBsAg- anti-HBs , anti-HBc basso titolo

Infezione occulta (minima necro-infiammazione, minima viremia)

Sieroconversione HBsAg- anti-HBs , anti-HBc

Ev. riattivazione

Immunotolleranza

Immunoeliminazione

Carrier cronico

Infezione attiva (danno epatico, alta viremia)

HBsAg, anti-HBc alto titolo

Infezione occulta (lesioni \pm minime, minima viremia)

Anti-HBc isolato (Tail end)

Ev. riattivazione

Infezione occulta HBV

- Presenza di HBV DNA nei tessuti (intermedi replicativi nel fegato),
- con viremia minima, rilevabile o meno,
- in soggetti HBsAg negativi,
- anti-HBc e anti-HBs pos o neg.

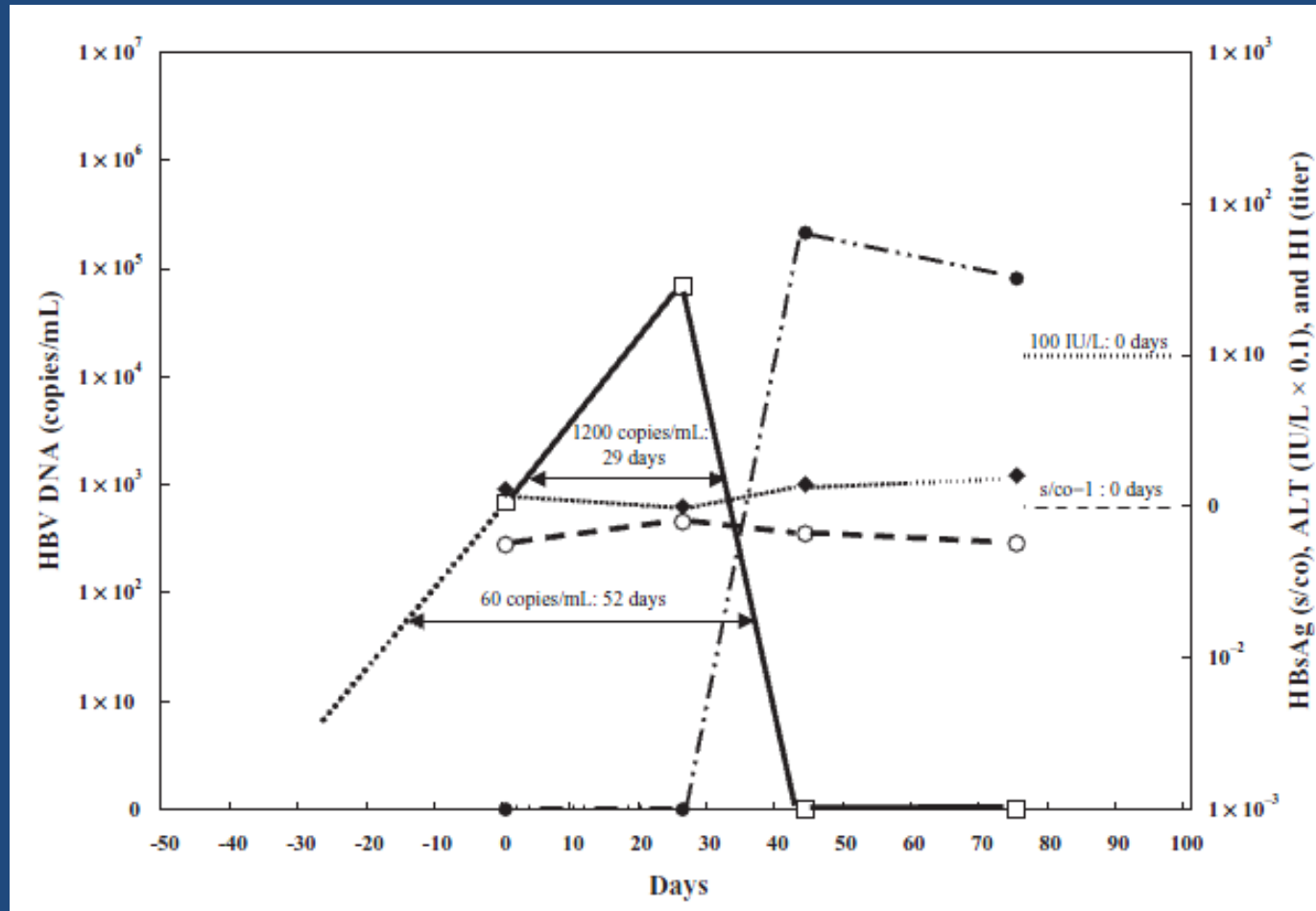
Definizione

- Falsa OBI
 - Infezione cronica >200 IU/ml con mutanti S
- OBI primaria (viremia < 200 IU/ml), con o senza mutanti S
 - Infezione acuta HBsAg neg, ev. anti-HBc e anti-HBs neg (perinatale ?)
- OBI secondaria (viremia < 200 IU/ml), con o senza mutanti S
 - Infezione acuta HBsAg+ con guarigione clinica, anti-HBs e replica ricorrente
 - Infezione cronica con progressiva perdita di marcatori, anti-HBc isolato (80%) o sieronegativa (20%), inibizione di replica e espressione

Infezione occulta acuta primaria

Giorni	ALT	DNA	HBsAg	AntiHBs	AntiHBc
0	16	<5	-	<10	-
15	13	5	-	<10	-
22	14	35	-	<10	-
25	18	46	-	<10	-
29	26	44	-	<10	-
31	15	10	-	<10	-
33	11	6	-	1.7	6.33
36	40	<5	-	6.97	11.89
40	33	neg	-	5.78	9.03
57	15	ND	-	3.56	3.41

Infezione occulta acuta primaria



Genesi dell'infezione occulta - 1

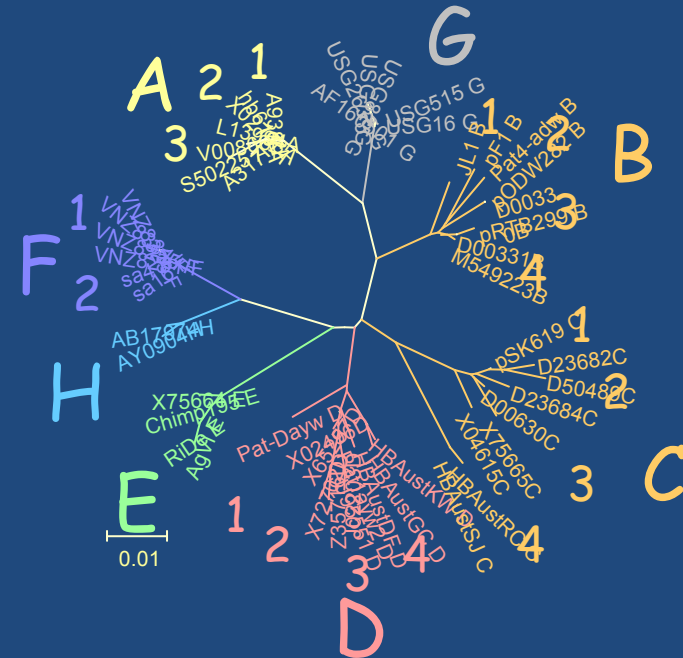
- L'infezione occulta è conseguenza del ruolo preminente del SI sui genotipi D e A2
- Mutazioni delle proteine S possono alterare infettività, tropismo cellulare e morfogenesi virale.
- Mutazioni di regioni regolatrici di espressione genica e replica svolgono un ruolo critico nell'infezione occulta da genotipo A1.

Genotipi HBV in sogg HBsAg+ e OBI

Country	HBsAg	DNA	Genotype A2	Genotype D	Other genotype(s)
Poland	+	+	50 (79.4)	13 (20.6)	0
	+	+	99 (80.5)	18 (14.6)	6 (5.2)
	-	+	6 (37.5)	10 (62.5)	0
Italy	+	+	59 (26.1)	165 (73.0)	2 (0.9)
	-	+	0	13 (100) ^a	0
Spain	+	+	192 (39.5)	234 (48.1)	60 (12.3)
	+	+	173 (64.2)	62 (23.1)	34 (12.7)
	-	+	4 (28.6)	10 (71.4) ^a	0

Genotipi HBV

Genotipo	Sottotipo sierologico (sierotipo)	Diffusione principale
A	adw2 ayw1	N Europa N America C-S Africa
B	adw2 ayw1	SE Asia
C	adw2 adrq+ adrq- ayr	SE Asia Australia
D	ayw2 ayw3 ayw4	Mediterraneo Medio oriente S Asia N America
E	ayw4	O Africa
F	adw2 adw4 ayw4	Polinesia C-S America
G	adw2	Europa N America
H	adw4 ayw4	N-C America



Genesi dell'infezione occulta - 2

- Le varianti del gene S non sono una causa maggiore di infezione occulta.
- La grande maggioranza dei casi di OBI consegue a una drastica soppressione della replica e dell'espressione virale, con virus competente.

Variabilità genomica OBI

HBV DNA intraepatico

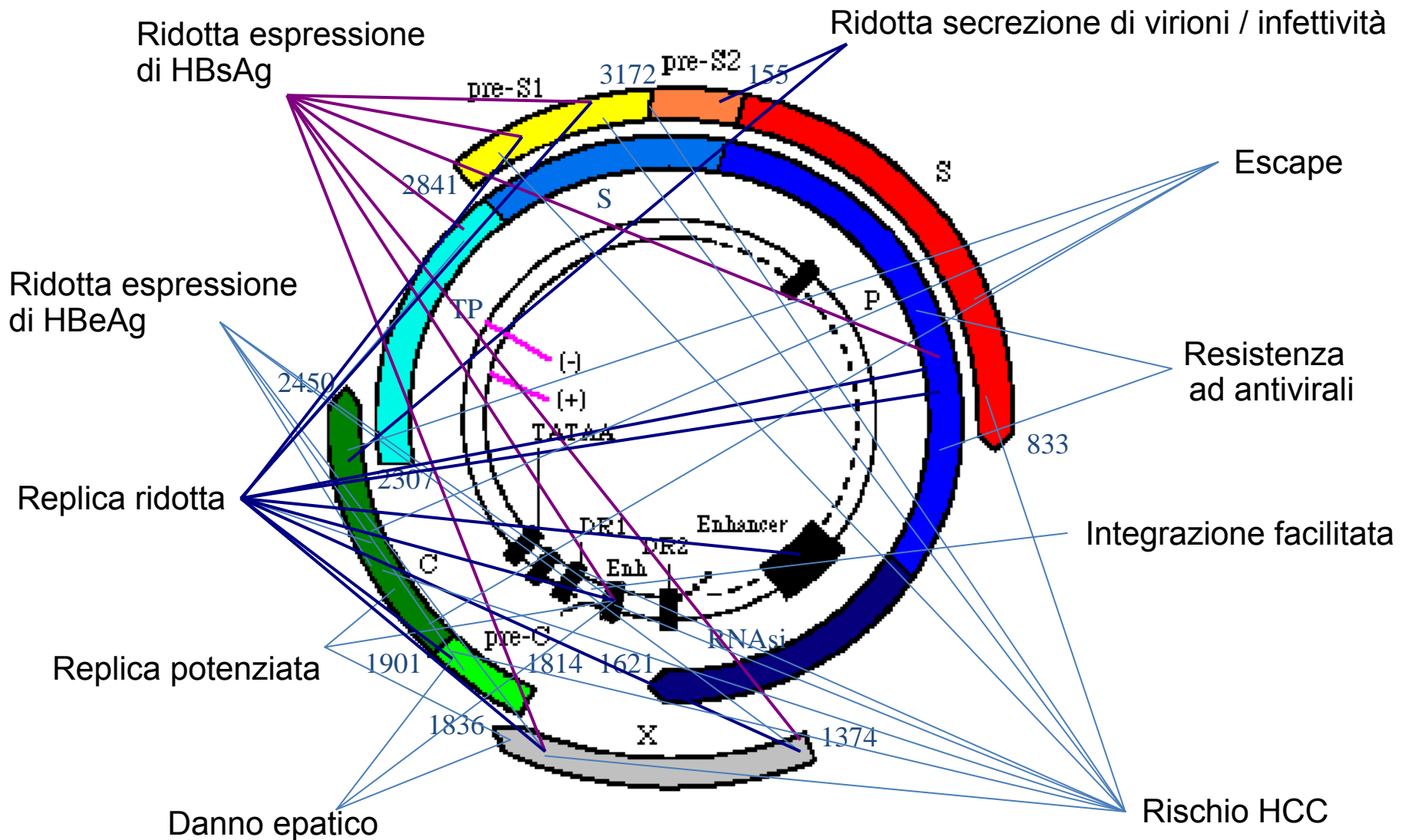
	preS1	preS2	MHR	Det a	Pre-C	Core	Pol	X
OBI (n 13)	1	4	10	9	8	13	5	6
	del	Start pm In-frame del	pm	pm	Stop codon	pm	YMDD pm	pm
HBsAg (n 4)	0	2	4	4	4	4	0	3
		In-frame del	pm	pm	Stop codon	pm		pm

Variabilità genomica OBI

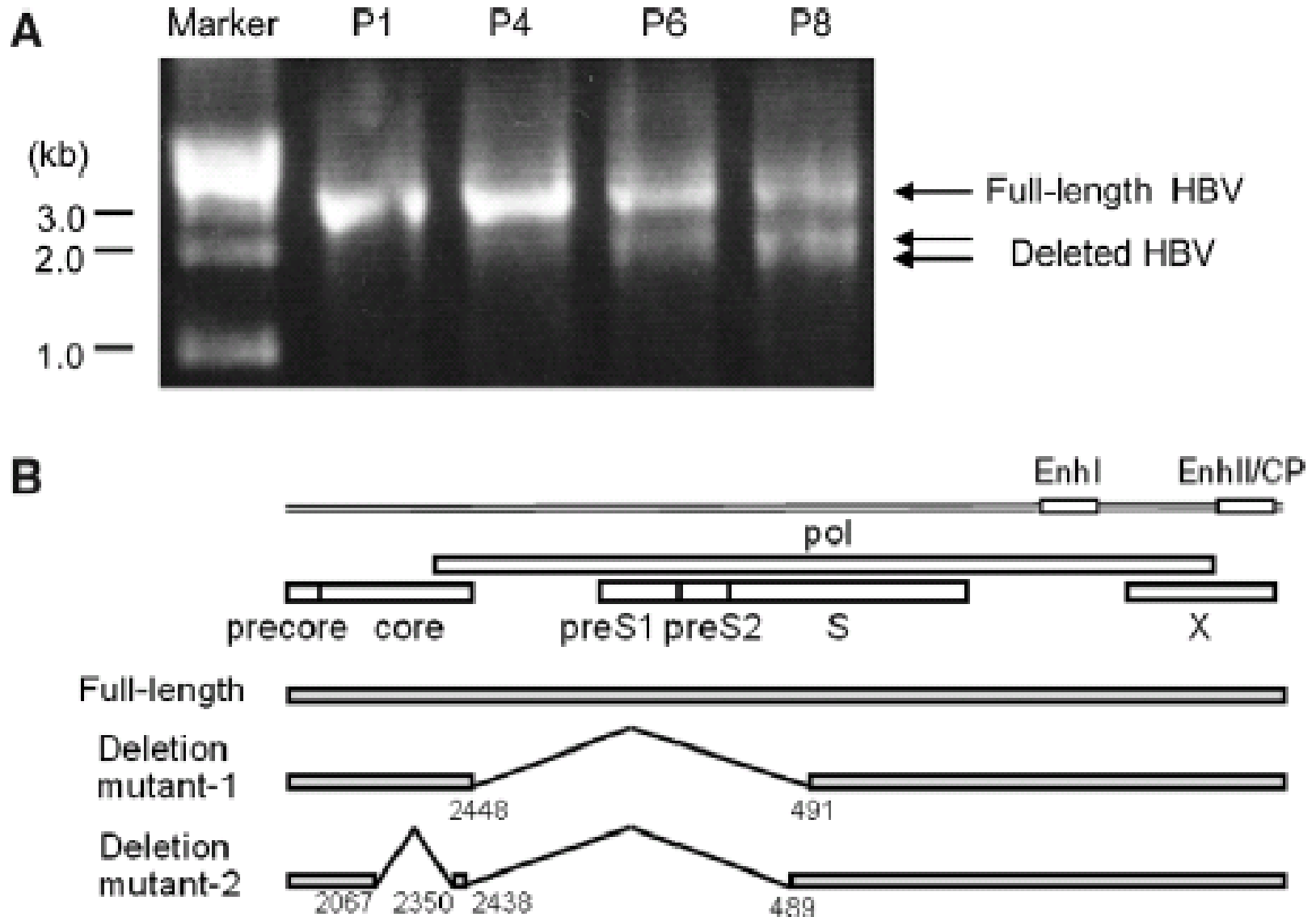
HBV DNA intraepatico

	S	Core			Pol	ENH I	ENH II	BCP
OBI (n 13)	12	9	8	2	0	1	3	4
	CD8 CTL epitope pm	CD4 T cell epitope pm	CD8 CTL epitope pm	CD8 CTL epitope pm	CD8 CTL epitope pm	TF binding site	SP1, HNF3 binding site	1762+ 1764
HBsAg (n 4)	1	3	2	1	0	0	0	3
	CD8 CTL epitope pm	CD4 T cell epitope pm	CD8 CTL epitope pm	CD8 CTL epitope pm				1762+ 1764

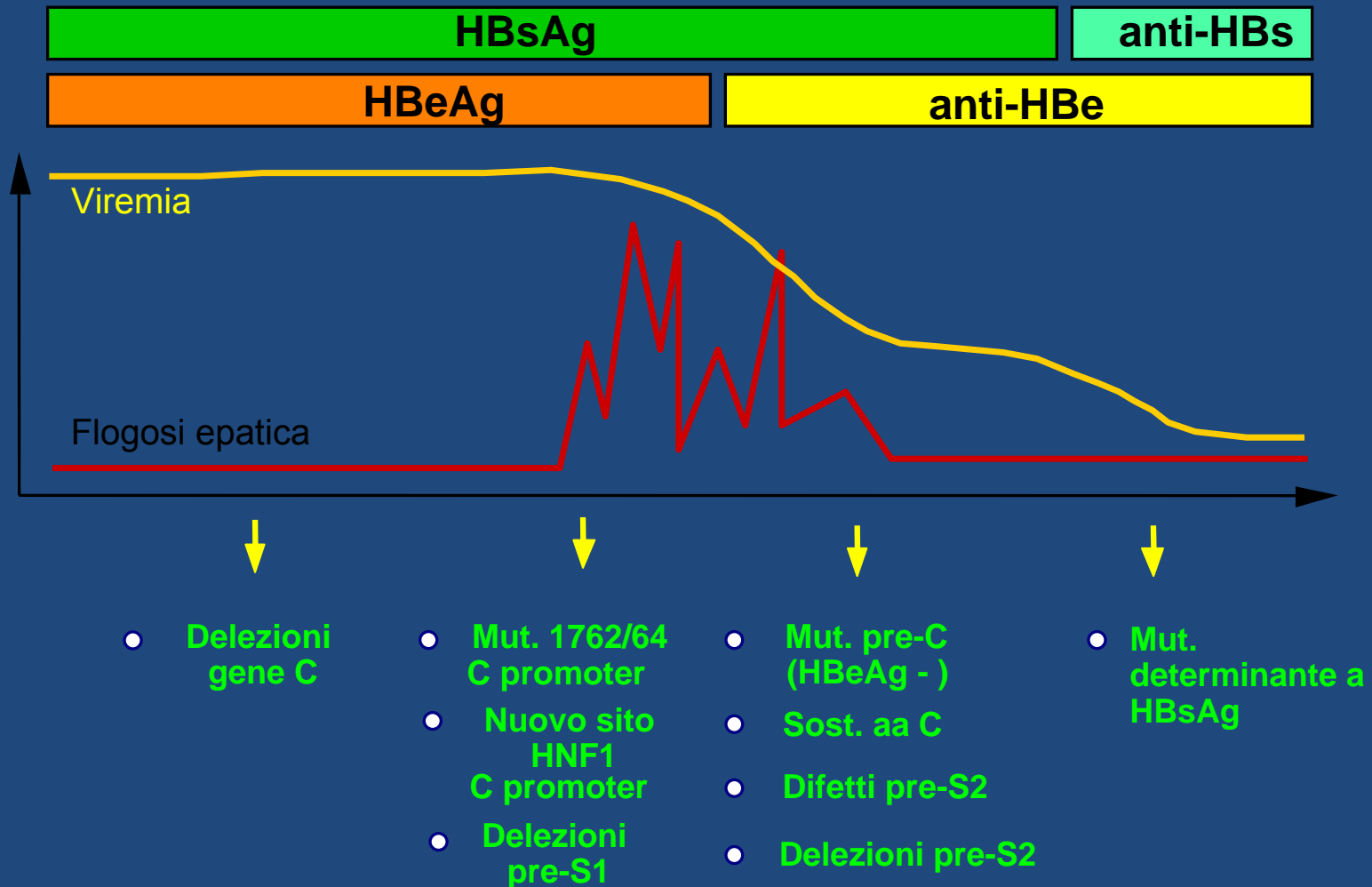
Genoma HBV e mutazioni



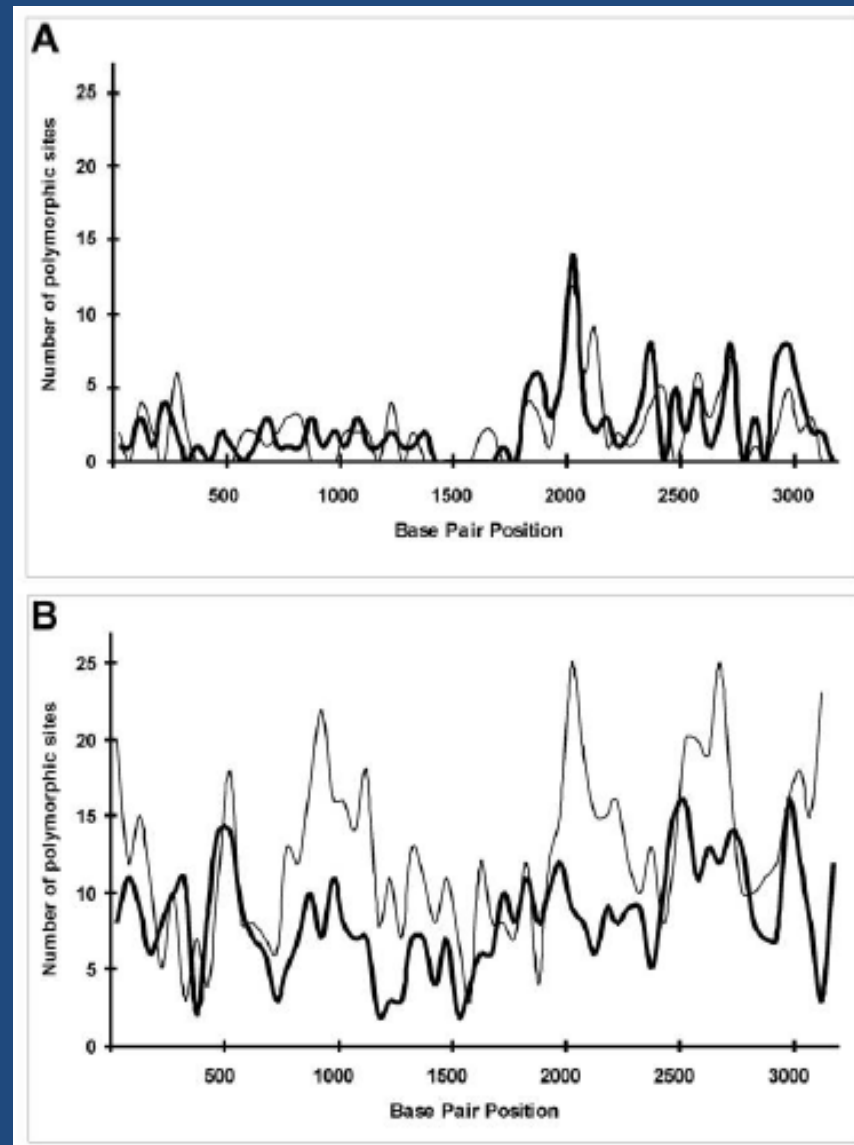
Delezioni



Mutazioni nell'infezione cronica HBV



Localizzazione di mutazioni e polimorfismi in OBI vs non-OBI



Genesi dell'infezione occulta - 3

- Non vi è chiara evidenza di hotspot mutazionali specifici dell'infezione occulta.
- Associazione di:
 - Pressione immunitaria
 - Alterazione di regioni regolatrici
 - Modifica di meccanismi post-trascrizionali
 - Fattori epigenetici

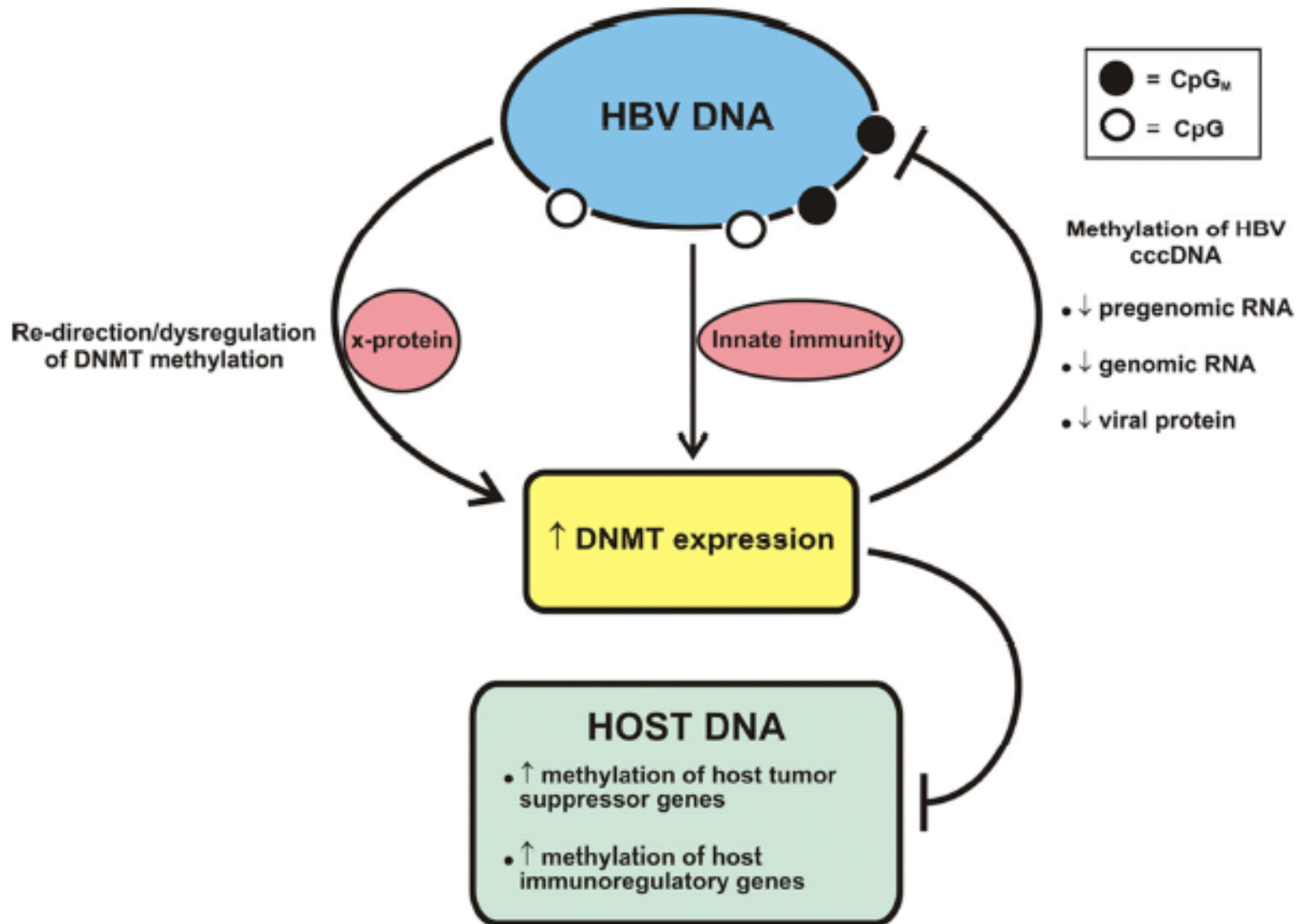
Genesi dell'infezione occulta HBV

Mutazione S (det. a dell'HBsAg, MHR)	Alterazione qualitativa di sequenza e conformazione S
Mutazione non S, integrazione, replica extraepatica, coinfezione. Meccanismi cellulari	Alterazione quantitativa con riduzione della replica, della sintesi o secrezione di proteine S, dell'infettività
Risposta immune (anti-HBs, TNF α , IFN)	Neutralizzazione dell'HBsAg (immuno-complessi) o inibizione della replica

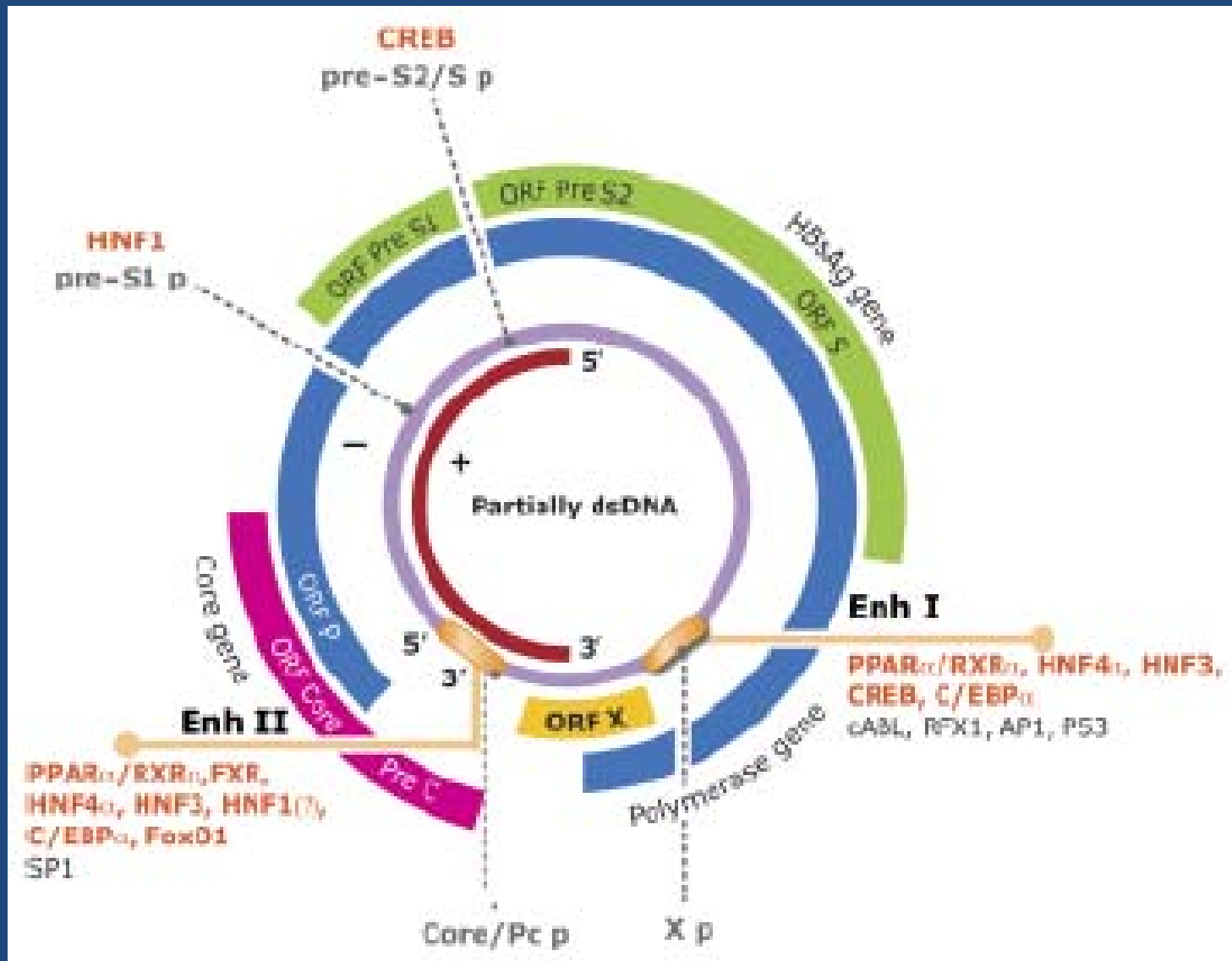
Meccanismi epigenetici

- cccDNA (minicromosoma virale) è soggetto a
 - meccanismi enzimatici (deacetilasi, DNA metiltransferasi DNMT),
 - fattori di trascrizione,
 - interazioni metaboliche
 - modifiche post-trascrizionaliche concorrono a modificarne l'espressione
- Modifiche spesso reversibili
- Inducibili da patogeni, agenti chimici, citochine, alimenti

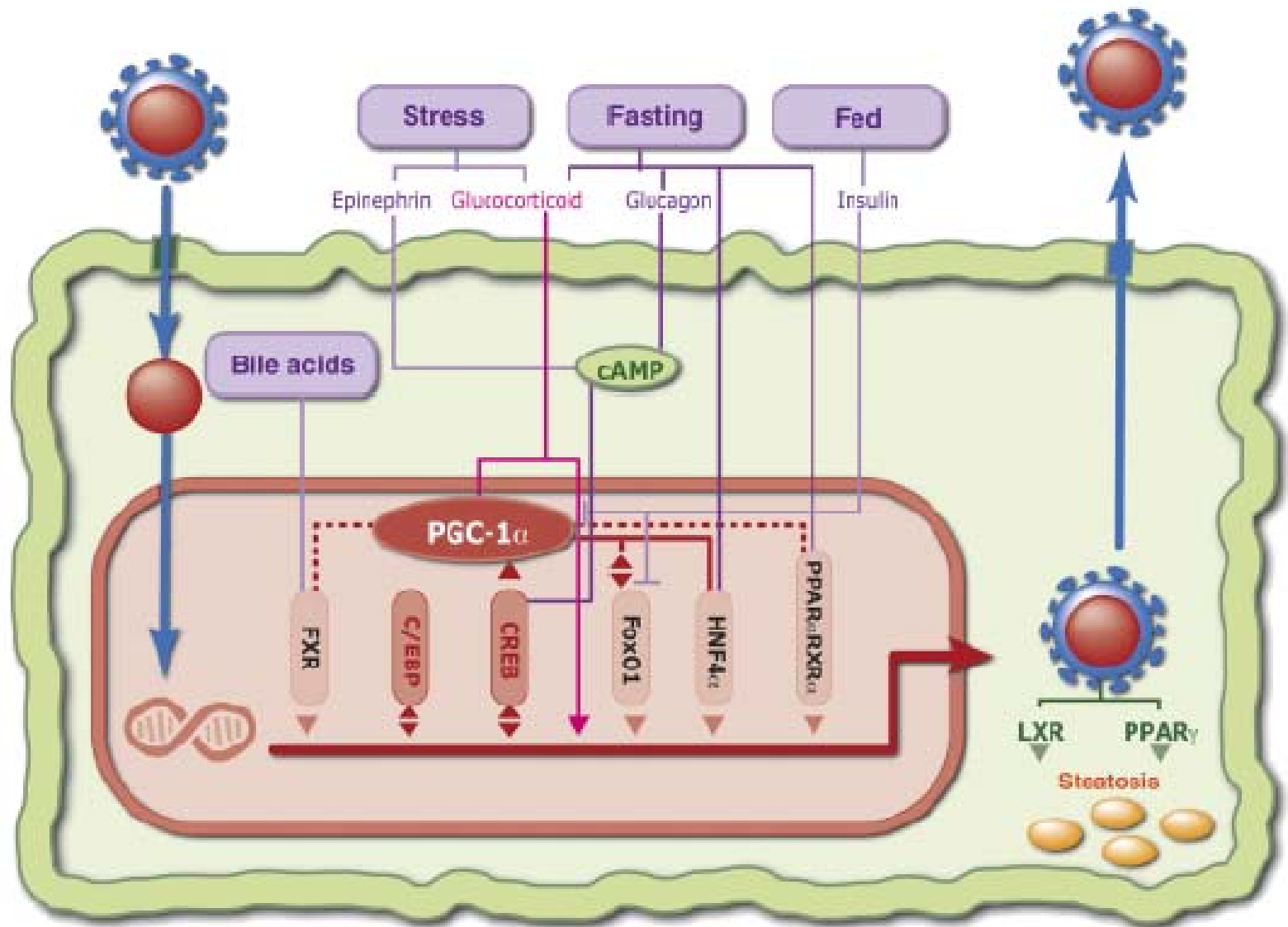
Metilazione



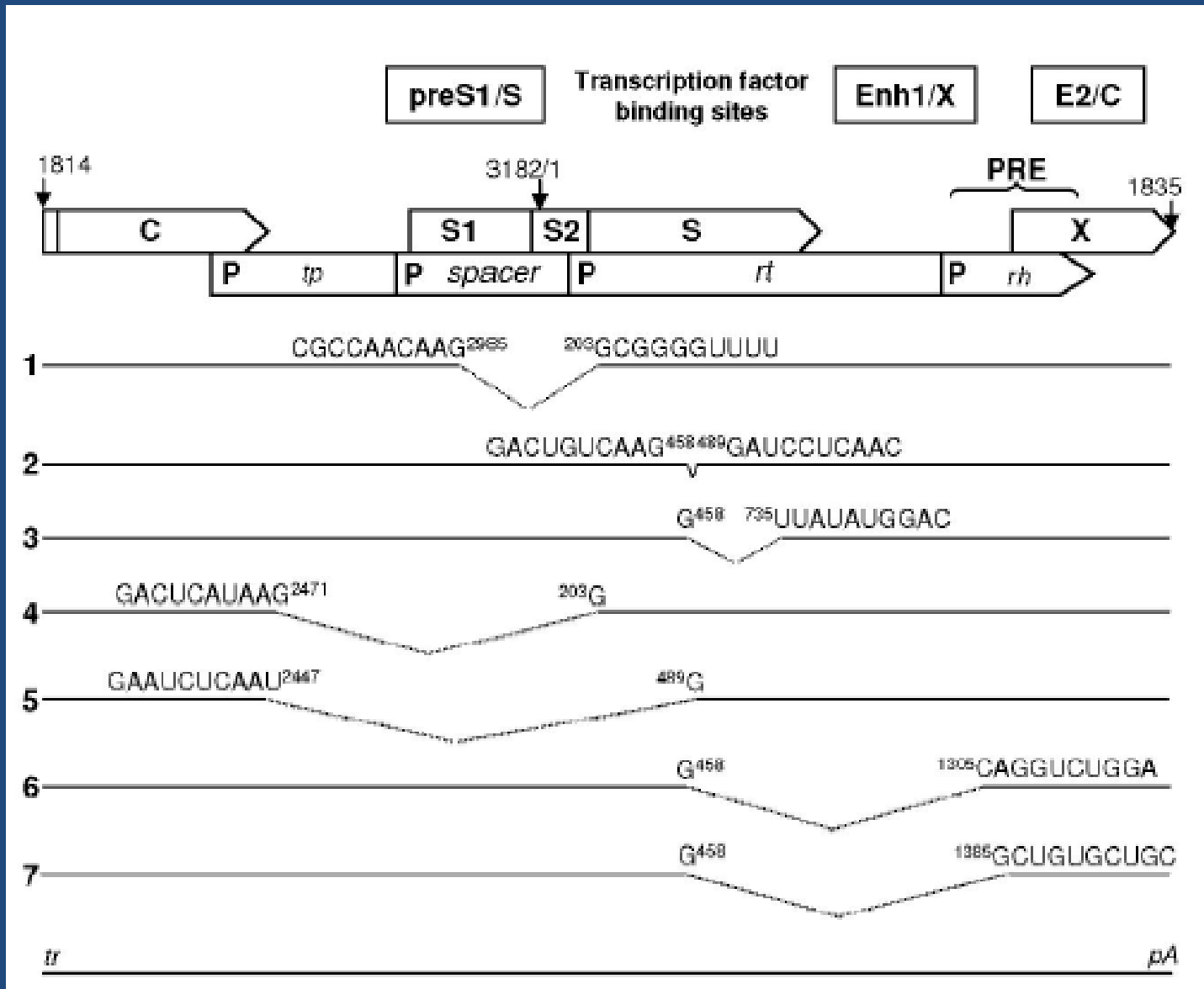
Fattori di trascrizione



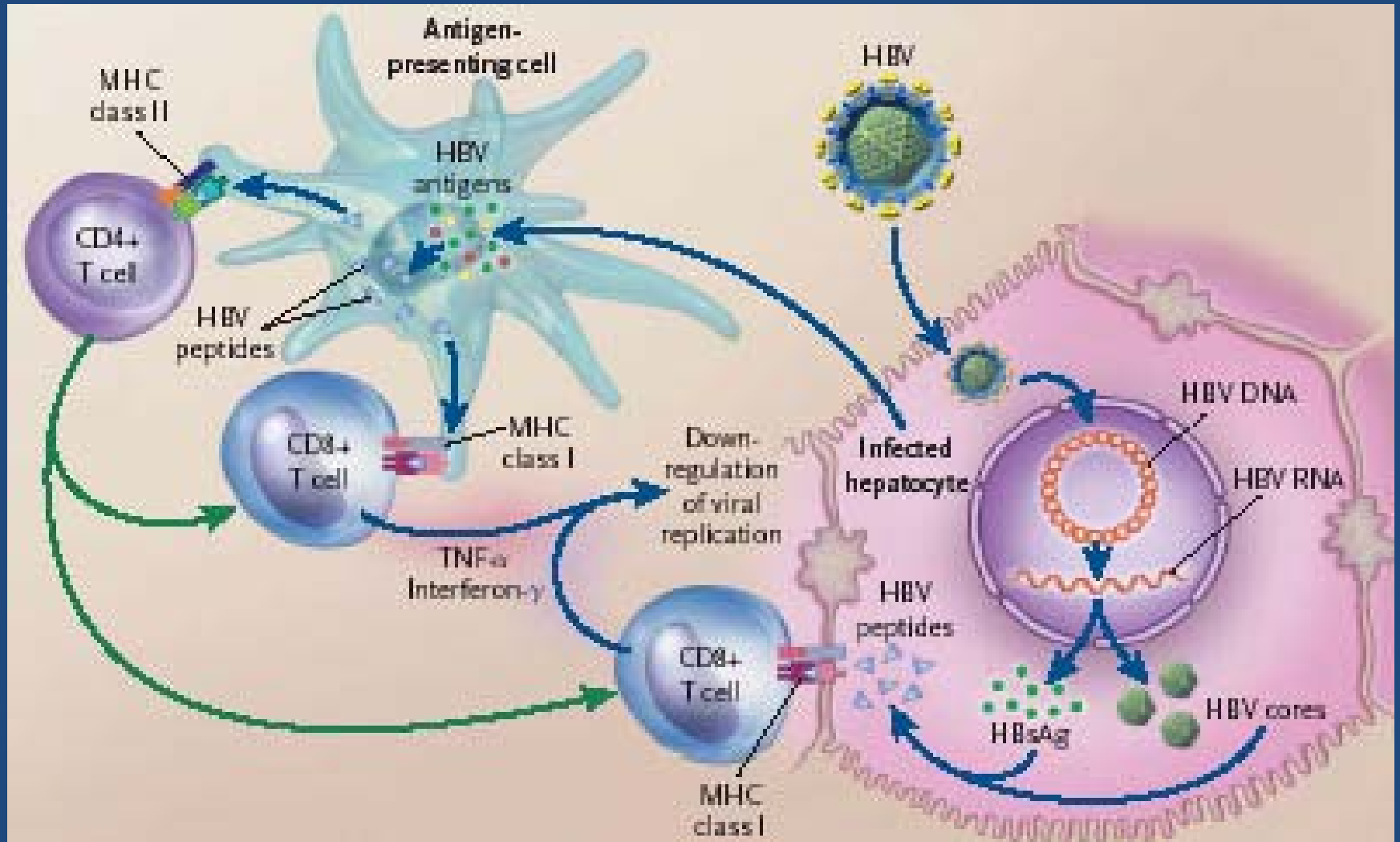
Interazioni metaboliche



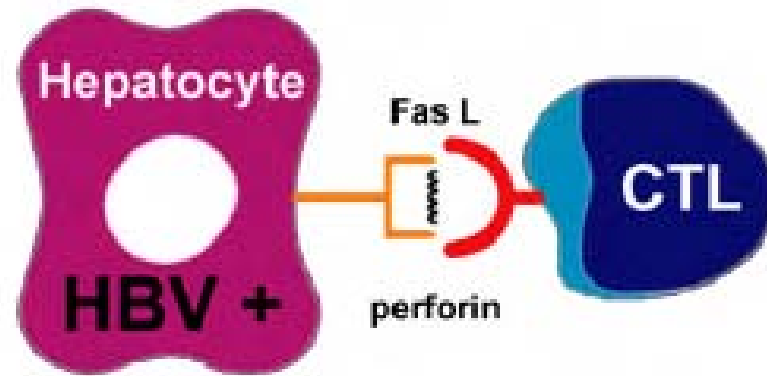
Pattern di splicing



Risposta immunitaria



Antigen Recognition



Apoptosis



Disease



IFN γ



Inhibition of
HBV Replication

Chisari 2010

Trasmissione da OBI

- Nell'infezione tardiva:
 - eccesso di particelle difettive HBsAg (casi HBsAg pos ma DNA neg),
 - bassa replica, genomi mutati o degradati (casi HBsAg neg ma DNA pos)
 - comparsa di anticorpi neutralizzanti (assenza di trasmissione fino a 2000 c/ml); possibili mutanti escape
 - bassa infettività delle particelle virali circolanti (trasmissione in OBI = 3-19% vs 50-81% in WP)
 - possibile trasmissione anche se DNA neg al test in uso

Trasmissione donatore-ricevente: caso 1

- Donatore
 - Genotipo A1
 - Load > 500 UI/ml
 - Wild type S, BCP, PC
 - HBsAg neg, anti-HBc neg, anti-HBs neg
 - Anti-HBs presente in unità co-trasfuse
 - Follow up: sieroconversione anti-HBc (42 gg dopo la donazione)
- Riceventi:
 - 1 (vaccinato, immunodepresso - GRC): epatite acuta dopo 13 mesi
 - 2 (vaccinato, immunodepresso – PLT): non infezione

Trasmissione donatore-ricevente: caso 2

- Donatore:
 - Genotipo D
 - Load 50 UI/ml
 - Mutazioni escape del det. a
 - HBsAg neg, anti-HBc pos, anti-HBs neg
- Riceventi:
 - 1 (epatite autoimmune): epatite fatale 6 mesi dopo la trasfusione
 - 2-4: anti-HBc+anti-HBs pos
 - 5-6: non segni di infezione

Trasmissione donatore-ricevente: caso 3

- Donatore:
 - Genotipo D
 - Load < LOD del MP NAT
 - Mutazioni S (non nel det.a)
 - HBsAg neg, anti-HBc pos, anti-HBs neg
- Riceventi:
 - 1: epatite acuta B fatale 3 mesi dopo la trasfusione
 - 2-3: anti-HBcIgM+anti-HBs pos
 - 4-5: anti-HBc+anti-HBs pos
 - 6-8: non segni di infezione

Trasmissione donatore-ricevente: caso 4

- Donatore:
 - Genotipo D
 - Load = LOD di ID NAT e PCR
 - Wild type
 - HBsAg neg, anti-HBc pos, anti-HBs neg
- Riceventi:
 - 1: epatite fulminante B fatale 3 mesi dopo la trasfusione
 - 2-3: anti-HBc pos
 - 4-13: non segni di infezione

Trasmissione donatore-ricevente: caso 5

- Donatore:
 - Genotipo D
 - Load 180 UI/ml
 - Mutazioni S non escape
 - HBsAg neg, anti-HBc pos, anti-HBs pos (12-53 U/I)
 - Follow up: load 16-40 UI/ml (7-16 mesi dopo)
- Riceventi:
 - 1 (PFC): epatite acuta B 4 mesi dopo
 - 2 (GRC): HBsAg pos 7 mesi dopo

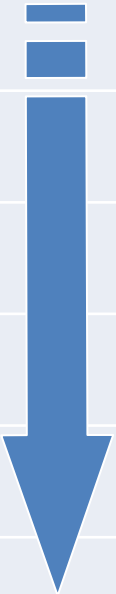
Diagnosi OBI post trasfusionale

- Variabilità dei segni di infezione nel ricevente (con o senza incremento ALT o AH):
- HBsAg, anti-HBc, HBV DNA
- Anti-HBc, anti-HBs, HBV DNA
- Anti-HBs, HBV DNA
- Anti-HBc, HBV DNA
- HBV DNA solo

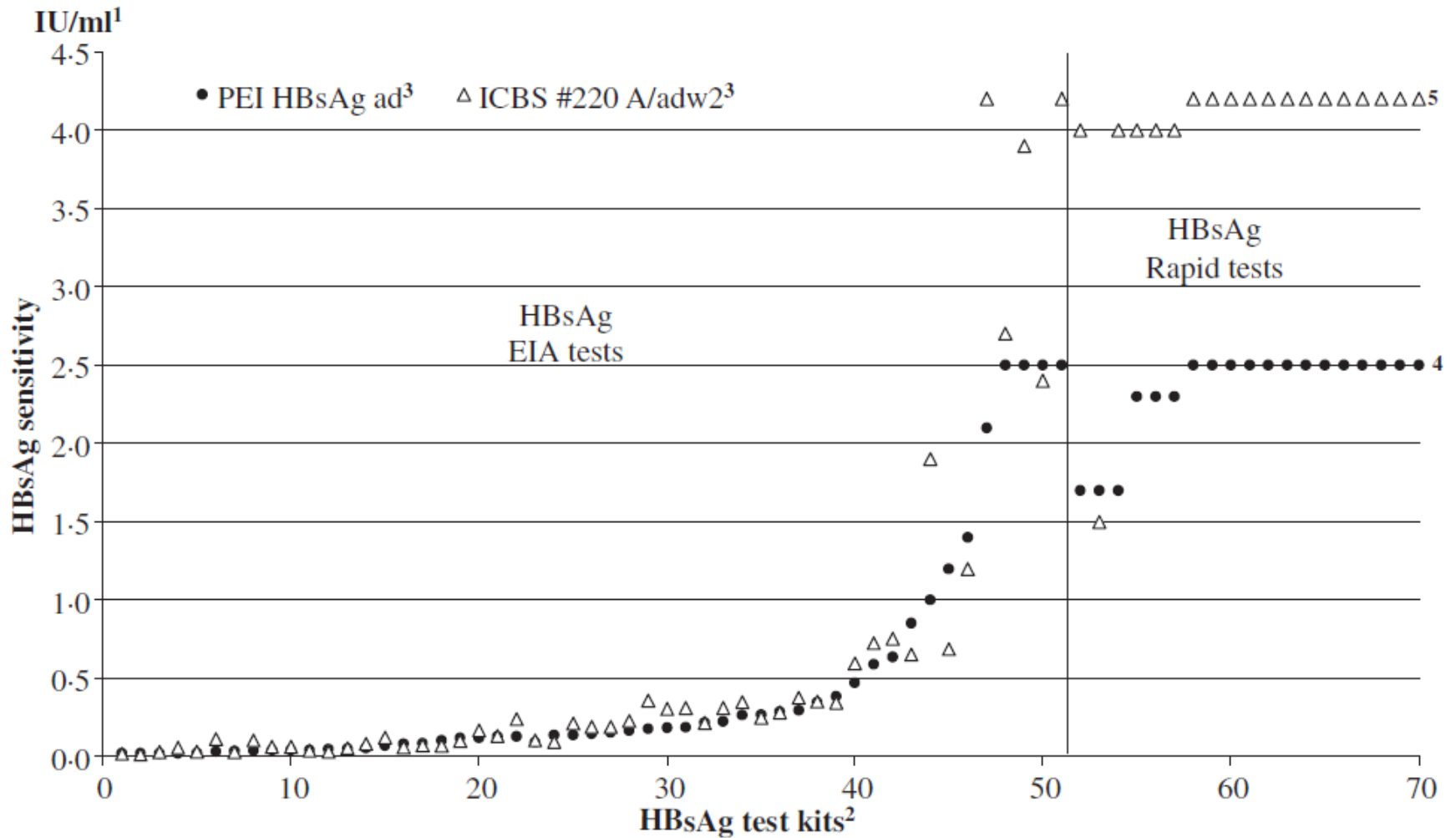
Test di screening post-donazione

Cronologia dell'introduzione in Italia

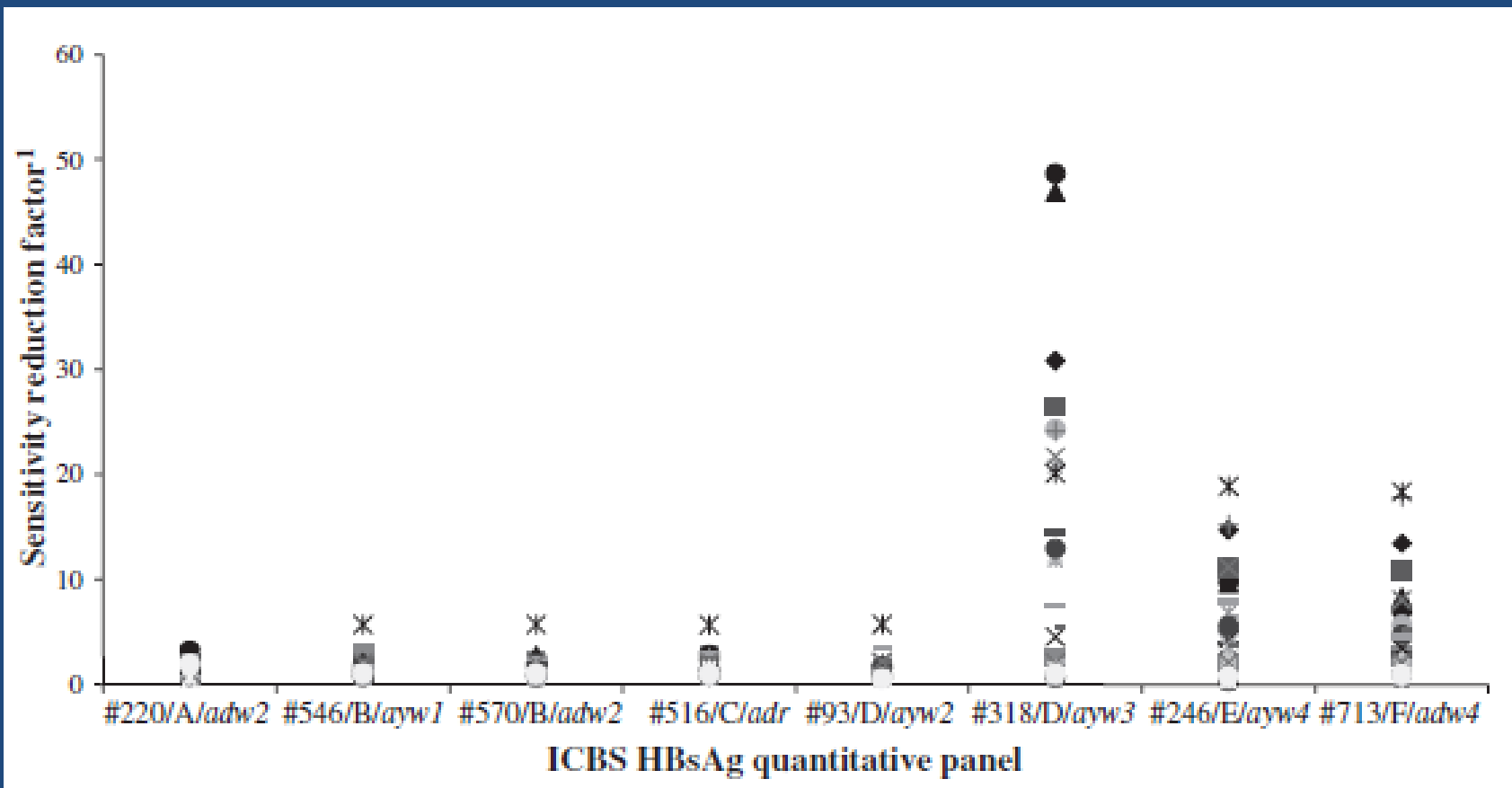
Marcatore	Raccomandazione	Normativa
ALT	1964	1990
Sifilide		1971
HBsAg	1974	1990
HIV 1+2 Ab	1985	1988-1993
HCV Ab		1990
NAT HCV	2001	2002
NAT HIV	2002	2006
NAT HBV	2004	2006



Screening sierologico HBV



HBsAg: riduzione di sensibilità vs genotipo A/adw2



Rilevazione di proteine S ricombinanti mutate

rS Proteins	Anti-HBs	EIA (Qualitative Assays)*					CIA (Quantitative Assays)†		Rapid Test (Qualitative Assays)‡		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control 1	Neg	23.0	30.7	22.0	30.5	24.0	9.7	18.7	++	++	++
Control 2	Neg	24.5	35.1	23.4	33.0	25.0	6.4	8.7	++	++	++
P10	Neg	18.5	26.1	8.0	15.9	9.0	2.0	0.7	++	+	+
P15	Neg	15.3	27.7	11.6	14.0	20.0	13.8	11.3	+	+	+
P17 ←	Neg	1.9	0.9	2.0	1.0	0.6	<0.05	<0.05	-	-	+
T6	Neg	20.5	32.9	19.3	32.6	19.9	3.8	6.0	++	++	++
T3	Neg	11.4	19.5	10.2	0.9	1.3	0.6	0.3	++	-	++
T8	Neg	20.4	25.7	15.2	22.5	17.1	4.9	6.3	++	++	++
T5	Neg	20.2	28.9	15.7	23.2	15.5	5.1	6.3	++	++	++
VA1	Neg	27.4	34.2	19.4	33.1	1.1	4.0	4.7	+	+	+
V11	Neg	13.7	13.5	1.7	0.7	0.9	1.7	4.7	-	-	-
CT2 ←	Neg	2.5	2.1	3.0	1.0	1.2	0.1	0.2	-	-	-
V1	Pos	1.3	1.4	0.4	0.9	1.3	<0.05	<0.05	-	-	-
V5	Pos	2.6	2.9	0.4	1.1	1.5	0.1	0.2	-	-	-
V6 ←	Pos	20.6	21.9	16.2	20.5	16.8	5.3	7.5	++	++	++
P1 ←	Pos	15.4	19.6	9.5	8.4	7.2	0.3	0.1	++	+	++
P2	Pos	0.6	3.1	0.4	1.0	1.6	<0.05	<0.05	-	-	-
P5	Pos	6.1	16.4	16.2	4.3	2.8	0.4	0.7	++	+	-
MD1	Pos	0.6	2.6	0.1	0.6	2.0	<0.05	<0.05	-	-	-
R1	Pos	1.2	1.6	0.7	0.6	1.5	<0.05	<0.05	-	-	-
BR1	Pos	6.7	1.6	0.4	0.6	1.3	<0.05	<0.05	-	-	-
BR2	Pos	1.3	2.4	0.8	1.0	0.8	<0.05	<0.05	-	-	-
P value§		0.011	0.008	0.060	0.034	0.130	0.045	0.035	0.172	0.175	0.042

Screening NAT

Standard dilutions (n = 24)	95% LOD (95% CI)		Tigris/cobas s 201 relative sensitivity (95% CI)
	Tigris	Cobas s 201	
WHO HCV RNA 96/798	7.5 (5.1-12.3)	17.9 (11.9-30.7)	2.39* (1.53-4.06)
Accurun HCV	9.4 (6.5-15.1)	22.2 (15.0-36.8)	2.35* (1.48-4.07)
HIV-1 RNA WHO 98/750	32.9 (23-52)	47.6 (33-76)	1.45 (0.99-2.19)
Accurun HIV-1	18.9 (14.2-26.7)	38.8 (26.7-56.1)	2.05* (1.43-3.08)
HBV DNA 97/746	10.9 (7.5-17.8)	4.12 (2.91-6.49)	0.38* (0.22-0.59)
Accurun HBV	4.11 (3.1-6.0)	2.73 (2.04-3.94)	0.67 (0.45-0.95)

Assal 2009

Efficacia dello screening NAT

Marker	Resa osservata/10 ⁶ unità		
	Italia	Svizzera	Germania
HCV RNA+/anti-HCV-	2.5	nd	0.73
HIV RNA+/anti-HIV-	1.8	nd	0.22
HBV DNA+/HBsAg-	57.8 (2.3+55.5)	23.85 (7.46+16.39)	1.37 (0.7+0.67)

Rischio residuo attuale in Italia

	Incidenza / milione di donazioni	
HCV	0.2	1: 5 milioni
HIV	0.4	1: 2.5 milioni
HBV	2.9	1: 282-357.000*

* Dato internazionale

HBV DNA intraepatico

98 sogg non epatopatici

	DNA+/testati	%
Anti-HBc+	10/16	62.5
Negativi per ogni marcatore HBV	6/82	7.3
Totale	16/98	16.3

P<0.0001

Raimondo 2008

Correlazione tra titolo di HBcAb e HBV DNA sierico (PCR)

HBcAb isolato titolo	Sogg n°	HBV DNA n°	positivi %
≥ 512	48	8	16.7
$\geq 64 \leq 256$	127	4	3.1
≤ 32	119	0	

lizuka 1992
294 donatori

HBcAb isolato titolo	Sogg n°	HBV DNA n°	positivi %
≥ 512	104	65	62.5
$\geq 64 \leq 256$	222	67	30.2
≤ 32	137	11	8.0

Yugi 2006
463 donatori
PCR LOD: 100 c/ml

Donatori anti-HBc positivi,
NAT non reattivi
Reattività in PCR

Donatori (n°)	Reattivi (n°)					Reattivi (%)
	S	Pol	X	C	Almeno 2	
90	1	9	5	6	3	3.4

Considerazioni finali

- Alcune varianti naturali sfuggono anche ai più recenti test commerciali HBsAg.

T.D. Ly, 2006

- Non c'è garanzia che l'anti-HBs neutralizzi tutte le varianti HBV in un portatore di HBV latente.

W.H. Gerlich, 2006

- Anche alti titoli di anti-HBs possono non essere protettivi se il ricevente è immunodepresso.

J.P. Allain, D. Candotti, 2009

- L'infezione HBV cronica con viremia <20 IU/ml e anti-HBc isolato può sfuggire alla NAT anche se molto sensibile e applicata a pool <10 o singola unità.

D. Candotti, J.P. Allain, 2009