

Le infezioni da virus epatotropi: la strategia diagnostica

A. Conti^a, M. Pradella^b

^aUOC Laboratorio Analisi cliniche e Microbiologia, ULSS 4 Alto Vicentino, Thiene-Schio (VI)

^bUOC Accreditamento ed Autorizzazione delle Strutture, ULSS 8, Asolo (TV)

Riassunto

Epatiti: un'emergenza planetaria. Le infezioni da HBV e HCV sono causa di epatiti acute e croniche e rappresentano da sole più della metà delle cause di epatopatie croniche; hanno un forte impatto sulla salute pubblica in termini di bisogno assistenziale e costituiscono non solo un problema di ordine medico-clinico, ma anche un devastante problema sociale per la qualità e la aspettativa di vita delle persone ammalate; non a caso l'OMS ha recentemente messo a punto una risoluzione finalizzata al riconoscimento delle epatiti come una priorità sanitaria globale e a uniformare gli sforzi per fronteggiarla in maniera efficace, intendendo promuovere e determinare sostanziali cambiamenti nelle politiche di prevenzione e informazione adottate dai Governi dei singoli Stati. I classici esami immunologici e quelli più moderni basati sull'amplificazione genica documentano sia l'esposizione sia la presenza di questi virus e sono anche utilizzati per monitorare il trattamento degli individui infetti e la profilassi con vaccinazione. Le nuove metodiche di diagnostica molecolare stanno cambiando radicalmente la storia naturale della malattia, permettendo anche di chiarire la genesi di entità nosologiche particolarmente insidiose e finora mal diagnosticate come l'epatite virale occulta.

Summary

Hepatic viruses infections: diagnostic strategy

Infectious hepatitis: a worldwide emergency. Infections by hepatitis B (HBV) and C (HCV) viruses are the most important agents of acute and chronic hepatitis, being involved in more than a half of all chronic liver diseases. They have a major impact on public healthcare both in terms of caregiving need and resources consumption. The challenge involves the Clinical Medicine, but more and foremost, it stands for a devastating social problem in order to determine heavy drawbacks in life expectancy and quality of these patients. No wonder then if the WHO recently defined hepatitis a global healthcare priority, calling for a coordinated effort to effectively face the multiple aspects of the diseases, also aiming to change policies and protocols for prevention and information among different countries. Substantial advances in diagnosis and therapy allow a new and more effective approach. In diagnostic terms, the "classical" serology has been integrated by new tests based on genic amplification (NAATs); they are able to show both exposure and presence of the viruses involved, and can also be used to monitor patient treatment.

A major change is on the move due to molecular diagnostics: the very natural history of the disease is changing since we learn more and more about the etiology and pathogenetic mechanisms of different nosological entities such as "occult" viral hepatitis.

Key-words: Infectious hepatitis, HBV, HCV, NAATs.

Epatite B Generalità

L'interesse scientifico per il virus dell'epatite B (HBV) e le sue manifestazioni cliniche non è diminuito negli ultimi anni; al contrario è stato ulteriormente alimentato dai significativi progressi intervenuti nella diagnosi e, soprattutto, nella terapia, mentre il ruolo epidemiologico rimane rilevante nella popolazione, anche a causa dei flussi dovuti

alla globalizzazione, e negli operatori sanitari, dove assume la doppia valenza di rischio lavorativo e rischio di infezione correlata all'assistenza. Le nuove tecniche diagnostiche che permettono, oggi, la definizione di diverse e nuove condizioni cliniche legate alla presenza del virus B, rendono più difficile e complessa l'interpretazione da parte del medico (Tab. I). Difatti, se le classiche condizioni di epatite acuta, cronica o di cirrosi risultano patrimonio oramai con-

Tabella I. Interpretazione dei pattern sierologici dell'Epatite B. www.cdc.gov/hepatitis/HBV/LabTesting.htm (modificato).

HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb IgM	HBcAb IgG	HBV DNA	ALT	Interpretazione
Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	+++	++++	Inf.acuta
Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Normali	Inf. in risoluzione Immunità
Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Normali	Vaccinato Responder
Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg+/-	+/-	Inf.cronica senza replicazione
Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	+++	+++/-	Inf.cronica con replicazione
Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	+++	+++	Inf.cronica Mutante Pre C con replicazione
Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Normali	Vecchia infezione risolta Falso positivo
Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	+/-	+/-	Inf.cronica "low level"

solidato della cultura medica, le più recenti definizioni di portatori attivi, inattivi, o addirittura "occulti", appaiono talvolta di difficile inquadramento. I diversi quadri assumono, inoltre, una differente valenza clinica nel soggetto immunocompetente e nell'immunocompromesso, una condizione, questa, sempre più diffusa secondaria all'uso sempre più esteso di farmaci immunosoppressori per il trattamento di patologie oncologiche, ematologiche, autoimmuni e per la medicina dei trapianti. Nell'immunodepresso, in particolare, alcune condizioni virologiche di scarso interesse generale assumono rilevanza clinica primaria per il rischio di forme acute ed iperacute di epatite che fanno seguito all'attiva replicazione virale indotta dall'immunodepressione farmacologica. Infine l'introduzione, nell'ultimo decennio, di numerosi farmaci antivirali e di nuove, sensibili tecniche di diagnostica molecolare come la *Real time* PCR, ha notevolmente cambiato la storia naturale della malattia.

Razionale per la richiesta di esami di laboratorio ai fini della diagnosi di epatite B^{1,2}

La pronta identificazione di soggetti affetti da epatite B cronica è essenziale per assicurare loro le cure necessarie per prevenire o ritardare l'evoluzione della malattia e prevenire la trasmissione del virus. L'appropriatezza nella richiesta di test per HBV si fonda su una anamnesi accurata, la valutazione delle condizioni del paziente, la presenza di fattori di rischio, di ogni precedente risultato di test analoghi e sulla possibilità, relativamente frequente e prognosticamente sfavorevole, di coinfezioni o sovrainfezioni da altri virus epatitici come HCV, HDV, CMV, EBV.

L'inserimento negli screening pre-operatori di esami per HBV o HCV non trova alcun razionale igienico-sanitario, nell'ottica della prevenzione del contagio da incidente occupazionale, né dal punto di vista epidemiologico, mentre studiare categorie di popolazione a rischio rappresenta un importante strumento di salute pubblica per i seguenti motivi:

1. l'epatite B cronica è una patologia severa, che può essere diagnosticata prima dell'insorgenza dei sintomi;
2. i test diagnostici da usare sono affidabili, poco costosi, minimamente invasivi;

3. nelle infezioni croniche, diagnosi e terapia tempestive garantiscono al paziente una vita di buona qualità;
4. il costo dello screening è ragionevole a fronte dei benefici;
5. la vaccinazione dei soggetti a rischio e dei suscettibili riduce la circolazione del virus;
6. il controllo del rischio clinico è indispensabile nelle organizzazioni sanitarie anche per motivi economici, legali ed assicurativi.

I marcatori sierologici dell'infezione da HBV²⁻⁴

HBsAg e HBsAb

L'HBsAg è la proteina di superficie del virus, la sua presenza indica che il soggetto è infetto e alti livelli di concentrazione sierica possono trovarsi sia nella epatite acuta che in quella cronica. Nella fase acuta dell'infezione l'esame si positivizza mediamente dopo 30 giorni dal contagio (range: 6-60) precedendo di 1-7 settimane l'aumento delle transaminasi e dell'insorgenza dei sintomi; si negativizza in 4-6 mesi nei pazienti che vanno incontro a guarigione, mentre la sua persistenza oltre i 6 mesi indica l'evoluzione verso una forma di infezione cronica. La scomparsa dell'HBsAg è seguita dalla comparsa del relativo anticorpo (HBsAb) che, nella stragrande maggioranza dei casi, coincide con l'acquisizione di immunità; in questa fase iniziale di sierconversione una piccola parte dei soggetti infetti presenta contemporaneamente sia HBsAg che anti-HBs a basso titolo, situazione peraltro compatibile anche con uno stato misdiagnosticato di portatore cronico in cui gli anticorpi anti-HBs non sono in grado di neutralizzare i virioni circolanti, verosimilmente per mutazione dei siti antigenici.

Nella maggior parte dei pazienti, l'HBsAb è rilevabile per anni o per tutta la vita, conferendo un'immunità a lungo termine, mentre in alcuni tende a negativizzarsi per poi ricomparire in caso di nuova esposizione al virus. Alcuni individui, tuttavia, presentano la cosiddetta "finestra sierologica" che corrisponde al periodo in cui l'HBsAg si negativizza e l'HBsAb non è ancora determinabile in circolo: in questa fase la diagnosi si basa sulla ricerca degli anticorpi anti antigene *core* di classe IgM (anti-HBc IgM). La sola presenza di HBsAb è riscontrabile, peraltro, nei soggetti *responder* che si sono sottoposti a vaccinazione.

HBcAb

L'antigene core dell'HBV (HBcAg) è un antigene intracellulare espresso negli epatociti infetti e quindi non presente nel siero; il suo anticorpo (anti-HBc) è indice di esposizione al virus ed è rilevabile nel siero per tutta la durata dell'infezione, quasi sempre per tutta la vita: in fase acuta è di tipo IgM e, come detto, può rappresentare l'unico marcatore di infezione nella fase "finestra". La presenza nel siero di IgM anti-HBc è sinonimo di malattia (infezione acuta o recente <6 mesi), scompare dal siero in 1-6 mesi ma si ripresenta ancora nelle cronicizzazioni. Poiché il valore predittivo di questo test è molto basso in soggetti asintomatici, il suo utilizzo per la diagnosi di infezione acuta dovrebbe essere limitato a pazienti con evidenza clinica di infezione o contatto dimostrato con persone infette. Le IgG anti-HBc persistono insieme con gli HBsAb nei pazienti che guariscono e coesistono con l'HBsAg nei pazienti che cronicizzano. La presenza isolata di anti-HBc in assenza di HBsAg o HBsAb, è stata riportata nello 0,4-1,7% dei donatori di sangue in aree a bassa prevalenza e nel 10-20% della popolazione nelle regioni endemiche. Questo riscontro può essere suggestivo di tre condizioni cliniche:

- periodo finestra di una epatite B acuta (in questo caso si tratta di anti-HBc di classe IgM);
- pregressa infezione da HBV guarita di vecchia data con HBsAb non più determinabile;
- infezione cronica da HBV di lunghissima durata con livelli di HBsAg non più determinabili, quadro sierologico che come il precedente può essere chiarito effettuando la determinazione della viremia.

HBeAg e HBeAb

La proteina HBe (HBeAg), presente in forma solubile nel sangue dei pazienti infetti, è un prodotto secondario della regione PreC e viene generalmente considerata marcatore di attiva replicazione virale ed infettività. Compare insieme all'HBV-DNA e DNA polimerasi subito dopo la comparsa di HBsAg e prima dell'inizio dei sintomi. Normalmente è presente solo per 3/6 settimane ma la sua scomparsa (assenza) non garantisce che il virus non sia in circolo.

La maggior parte dei pazienti HBeAg positivi ha una malattia epatica attiva, tranne che nelle infezioni perinatali nelle quali possono esserci transaminasi normali e minima infiammazione epatica. La sieroconversione da HBeAg al relativo anticorpo (HBeAb) si associa di solito alla scomparsa dell'HBV-DNA nel siero e alla remissione della malattia, anche se in un certo numero di soggetti con epatite cronica attiva la presenza di HBV-DNA coesiste con quella di HBeAb. In questa tipologia di pazienti, che presenta un quadro di epatite cronica severa ed è prevalente nel bacino del Mediterraneo, è rilevabile una popolazione virale con mutazione puntiforme in posizione 1896 della regione *pre-core*, mutazione che rende impossibile la trascrizione della proteina "e".

La diagnostica molecolare nella gestione dell'infezione da HBV⁵⁻⁷

Quattro tipi di esami molecolari sono oggi disponibili per la diagnosi e la gestione dell'infezione da HBV:

1. Prove quantitative per la carica virale.
2. Prove per la genotipizzazione.
3. Prove per le mutazioni di resistenza ai farmaci.
4. Prove per le mutazioni *core promoter/precure*.

I test per la determinazione della carica virale su plasma o siero sono di gran lunga quelli più utilizzati. Tutte le linee guida internazionali raccomandano, sia per decidere se intraprendere o meno il trattamento, sia nel monitoraggio della malattia, al fine di predire la risposta alla terapia e verificare l'eventuale emergenza di resistenze ai farmaci antivirali, la quantificazione basale di HBV-DNA oltre ai dosaggi di HBeAg/HBeAb e ALT. Tecniche molecolari ad elevata sensibilità sono indispensabili per la diagnosi di epatite cronica B e di epatite occulta, laddove la carica virale può essere molto bassa. La maggior parte dei metodi utilizzati per il dosaggio di HBV-DNA in ambito clinico era basata sulla *Polymerase Chain Reaction* (PCR) con limiti di sensibilità di 50 – 200 IU/mL (250 – 1000 copie/mL) e un *range* dinamico non più elevato di 4-10 log₁₀. La recente introduzione della tecnologia *Real-time* PCR ha migliorato la sensibilità (5-10 IU/mL) e consentito un più ampio range dinamico di misura (più di 8-9 log₁₀) (Tab. II).

In risposta alla necessità di standardizzare, è stato creato uno standard internazionale (WHO 97/746), ottenuto da una preparazione di riferimento a base di genotipo A EUROHEP. Nella preparazione WHO, 1 IU corrisponde a circa 5.4 genomi equivalenti (copie) per mL; tuttavia, una conversione accurata dipende significativamente dalla configurazione del metodo utilizzato per la quantificazione di HBV; ad esempio, per il metodo Amplicor 1 UI corrisponde a 7.3 copie, per il metodo Hybrid Capture II corrisponde a 2.3 copie, per il metodo VERSANT 4.5, ecc.

L'elevatissima sensibilità indotta dal consistente miglioramento delle tecniche analitiche pone importanti problemi di interpretazione sui livelli "soglia" di viremia che indicano risposta al trattamento antivirale. Poiché HBV-DNA si ritrova anche in persone che hanno siero-convertito dopo una epatite acuta, la completa *clearance* virale non può essere un realistico *endpoint* della terapia. Per la diagnosi di epatite cronica venne in passato scelto un valore arbitrario di 20.000 IU/mL, oggi, tuttavia, è possibile trovare valori molto più bassi in pazienti certamente affetti da epatite cronica, cirrosi e cancro del fegato. Inoltre è esperienza comune in pazienti con epatite cronica vedere livelli di HBV-DNA fluttuanti, nel tempo, da poche IU/mL a diversi milioni.

Ecco perché, ai fini della prognosi e delle opzioni di trattamento, è molto più importante affidarsi a dosaggi seriati della carica virale piuttosto che a un singolo arbitrario valore soglia, data la ormai nota constatazione che livelli anche bassi di HBV-DNA (3-5 log₁₀ IU/mL) in pazienti HBeAg negativi o con cirrosi iniziale sono spesso associati a malattia epatica progressiva.

La misura dell'HBV-DNA è critica per la diagnosi e la gestione clinica dei pazienti HBeAg negativi/HBeAb positivi (mutazione *core promoter/precure*) poiché rappresenta l'unico marker di replicazione virale monitorabile. La distinzione fra soggetti HBeAg negativi affetti da epatite cronica e portatori inattivi può creare difficoltà a causa delle fluttuazioni delle ALT e dei livelli di viremia. Per distinguere queste due popolazioni di soggetti durante il

Tabella II. Reagenti e Metodi commerciali per la quantificazione dell'HBV DNA. Da A.Valsamakis Molecular testing in the diagnosis and management of Chronic Hepatitis B (modificato) Journal Microbiology Review July 2007.

Test/Produttore	Metodo	Sensibilità analitica	Range lineare
Real time HBV PCR Abbott Molecular	Real Time PCR	4 IU/mL	Fino a 4.000.000.000 ~
Hybrid Capture II Digene	Hybrid capture	1.9 x 10 ⁵ copie/mL	Fino a 1.700.000.000 ~
Ultra sensitive Hybrid Capture Digene	Hybrid capture	8.000 copie/mL	Fino a 1.700.000.000 ~
Artus HBV PCR Qiagen Diagnostics	Real Time PCR	54 IU/mL	Fino a 3.600.000.000 ~
VERSANT HBV DNA 3.0 Siemens	bDNA	3.300 copie/mL	Fino a 100.000.000 ~
COBAS TaqMann HBV 2.0 Roche Diagnostics	Real time PCR	20 IU/mL	Fino a 110.000.000 ~
COBAS Amplicor HBV Monitor Roche Diagnostics	PCR Semiautomatica	200 copie/mL	Fino a 200.000 ~

monitoraggio è stata identificata una soglia di 2.000 IU/mL. Un'altra importante indicazione clinica al dosaggio di HBV-DNA è rappresentata dalla diagnosi di epatite occulta, definita dal riscontro di bassi livelli HBV-DNA nel sangue periferico o nel fegato (generalmente <2000 IU/mL) tramite metodiche Nucleic Acid Amplification Test (NAAT) ad alta sensibilità (*Nested* o *Real time* PCR) in pazienti con HBsAg negativo, con HBcAb positivo (ma anche in pazienti senza alcun marcatore sierologico di HBV): si tratta di un quadro caratterizzato dalla forte soppressione della replicazione e dell'espressione genica del virus. E' stata riscontrata in pazienti con cirrosi criptogenetica, in individui HBV sieropositivi guariti da infezione acuta, in individui HBV sieronegativi con ALT nella norma. L'infezione può persistere per anni asintomatica; le coinfezioni, la tossicodipendenza e l'immunodepressione possono favorire l'aumento dei livelli di HBV-DNA senza espressione di HBsAg. Nelle sequenze di HBV ottenute da pazienti HBsAg negativi è stata osservata una pletora di mutazioni (mutazioni puntiformi, delezioni, splicing ecc.) ma non è chiaro se queste mutazioni siano la causa o la conseguenza di epatite occulta. Molte di queste infezioni occulte sono associate a mutazioni residenti nel gene S e/o in regioni che governano la regolazione/espressione del gene S, ma anche nella regione core C e nel gene polimerasi P.

La prevalenza di epatite occulta sembra correlata al rateo di infezione endemica e, sebbene teoricamente spiegabile per azione di virus con deficit replicativi, il ritrovamento di cccDNA, trascritti di RNA e RNA replicativi pregenomici intermedi in una larga porzione di pazienti suggerisce che la maggior parte di queste infezioni sia dovuta a virus *wild-type* a basso livello di replicazione. Attualmente un consenso per la diagnosi di epatite occulta manca; i metodi NAAT vengono utilizzati in diversi contesti clinici: malattie epatiche criptogenetiche, HCC, immunodepressione indotta in pazienti a rischio, pazienti con positività isolata di HBcAb, trapianti solidi. I campioni epatici ottenuti da biopsia sembrano rappresentare una migliore opzione rispetto al siero, a causa della maggiore quantità

di HBV DNA mediamente riscontrabile nel tessuto.

Utilità della genotipizzazione di HBV

Sono stati identificati 8 genotipi di HBV, etichettati con le lettere da A a H, con prevalenza variabile su scala mondiale e regionale in relazione alla località geografica.

Il genotipo di HBV è una variabile che può influenzare l'*outcome* sia in termini progressione della malattia epatica che di terapia con Interferone.

Per quanto riguarda la progressione di malattia, studi recenti hanno mostrato che il genotipo A è associato a una lenta progressione, che il genotipo B è associato con la sier conversione di HBeAg in uno stadio più precoce di infezione e che raramente porta all'evoluzione della malattia in HCC, che il genotipo C causa l'evoluzione in cirrosi più frequentemente e precocemente dei genotipi B e D ed è associato ad alta incidenza di HCC.

Per quanto riguarda la risposta al trattamento antivirale, i genotipi A e B si associano ad un più alto tasso di siero conversione di HBeAg se comparati con i genotipi C e D.

Lo sviluppo di resistenze sembra essere equivalente tra i differenti genotipi nei confronti di Lamivudina, mentre esiste differenza riguardo alla sensibilità all'Interferone.

Test di resistenza antivirale

La frequenza con cui vengono selezionati mutanti resistenti dipende da:

- i livelli di HBV-DNA evidenziati prima del trattamento antivirale;
- la rapidità della soppressione virale indotta;
- la durata del trattamento e le eventuali precedenti esposizioni a terapie antivirali;
- le tecniche analitiche utilizzate per l'indagine;
- la tipologia di pazienti testati.

Dopo introduzione degli analoghi nucleosidici, la prima manifestazione di resistenza è il riscontro dell'aumento di più di 10 volte (>1 log₁₀) della concentrazione di HBV rispetto alla concentrazione più bassa ottenuta in un paziente con iniziale risposta alla terapia, a cui segue l'incre-

mento sierico delle ALT al di sopra dei valori normali; la mutazione di resistenza agli antivirali può precedere di mesi o addirittura anni l'aumento delle ALT.

Poter identificare prontamente la mutazione e modificare il trattamento terapeutico è essenziale per scongiurare la riattivazione della malattia e l'insufficienza epatica, specie nei pazienti immunocompromessi e nei cirrotici. Un'altra potenziale conseguenza è la cross-resistenza con altri farmaci antivirali, e possibili gravi limitazioni a opzioni terapeutiche (es. cross-resistenze osservate fra lamivudina e telbivudina, entecavir, emtricitabina). La resistenza può essere evidenziata con metodi fenotipici o analisi di sequenza; è un tipo di diagnostica costosa e indaginoso, non alla portata di tutti i laboratori clinici e non esente da limitazioni. L'analisi fenotipica implica la verifica della replicazione di un mutante in corso di terapia e richiede una qualche forma di ingegneria genetica (es. la costruzione di un clone mutante espresso in modelli di baculovirus) il cui prodotto sia espresso in un sistema di colture cellulari. Questo approccio è teoricamente più efficiente nella scoperta di un complesso set di mutazioni in grado di conferire resistenza al virus ma risulta troppo costoso e tecnicamente difficile, praticamente attuabile solo nei laboratori di ricerca. Il sequenziamento diretto identifica mutazioni già conosciute e altre potenzialmente nuove, ma non è sufficientemente sensibile per i mutanti resistenti che sono presenti a basse concentrazioni. In confronto, metodi basati sulla ibridazione sembrano essere più sensibili e meno complessi, ma anche questo approccio ha i suoi svantaggi: identifica solo mutazioni conosciute, richiede sonde individuali per ogni singola mutazione, produce possibili falsi negativi dovuti a singoli polimorfismi nucleotidici senza effetti sul fenotipo ma in grado di pregiudicare il legame della sonda.

Identificazione delle mutazioni

Core Promoter/Precore in soggetti HBeAg affetti da epatite cronica

La diagnosi di Epatite cronica B HBeAg negativa viene posta sostanzialmente dalla combinazione di risultati di markers virologici (HBsAg⁺, HBeAg, HBV-DNA⁺), sierologici (HBeAb⁺) e da segni bioumorali o tissutali di danno epatico (ALT aumentate o segni istologici di necrosi/infiammazione). Sono disponibili sul mercato test commerciali per l'identificazione di mutazioni che bloccano l'espressione di HBeAg (PCR plus Hybridization e Hybridization/direct sequencing).

Il primo metodo identifica 3 mutazioni (nucleotidi basali core promoter 1762 e 1764 e codone precore 28), mentre il secondo ne evidenzia solo 2 (nucleotide basale core-promoter 1764 e codone pre-core 28). Ambedue i metodi mostrano buone prestazioni analitiche nel rilevare mutazioni in popolazioni virali miste (*wild-type* più virus mutante), mentre il metodo PCR plus Hybridization ha maggiore sensibilità in campioni a bassa e bassissima carica virale.

Epatite C Generalità

L'epatite da virus C rappresenta di gran lunga la causa maggiore di malattia epatica nel mondo, la principale cau-

sa di morte per malattia epatica e la più frequente indicazione al trapianto di fegato.

Alcuni studi suggeriscono che la mortalità correlata con l'infezione da HCV (morte per insufficienza epatica o il carcinoma epatocellulare HCC) continuerà a crescere nelle prossime due decadi. La possibilità di guarigione dipende dalla diagnosi accurata e dalla conseguente adozione di un precoce protocollo terapeutico antivirale. Nel mondo si calcolano 180 milioni di persone infettate da HCV, di cui in media il 25% (range: 15% - 45%) guarirà spontaneamente mentre il 75% rimarrà cronicamente infetto. Di questi ultimi, il 15% - 25% andrà incontro ad insufficienza epatica grave, con rischio di sviluppo di HCC e indicazione prioritaria al trapianto epatico. Nel restante 55% però, la moderna farmacoterapia antivirale combinata (es. Interferone pegilato e Ribavirina) è in grado di indurre una sostanziale remissione della malattia, con riduzione della necrosi/infiammazione tissutale e della fibrosi e con un netto miglioramento degli esiti a lungo termine. Ecco spiegata la necessità di una identificazione tempestiva e accurata della infezione attiva da HCV.

Diagnosi di Laboratorio

La diagnosi di infezione da virus epatite C si basa su esami immunologici per l'identificazione di anticorpi sierici specifici. Tuttavia questi esami non riescono a discriminare tra infezione acuta, remota o persistente; pertanto è necessario ricorrere allo screening di HCV-RNA con metodiche NAAT quantitative come metodo di scelta per la conferma di una infezione attiva sia nei pazienti immunocompetenti che risultano HCVAb⁺ che negli individui immunocompromessi che non producono anticorpi anti-HCV. Un metodo NAAT quantitativo è anche in grado di dare informazioni sui livelli di virus circolante, utili per l'impostazione di un protocollo terapeutico.

La distinzione fra epatite acuta e cronica dipende dalla presentazione clinica, dalla presenza di sintomi o ittero, dal riscontro anamnestico di ALT aumentate e per quanto tempo. In un soggetto immunocompetente esposto al virus, HCV-RNA è rilevabile nel siero dopo due settimane mentre HCVAb si positivizza dopo 2-3 mesi.

Test sierologici⁸⁻¹¹

I test per gli anticorpi anti-HCV trovano la loro indicazione clinica nello screening o nella diagnosi di infezione e si configurano come metodiche EIA (Enzyme ImmunoAssay) o CIA (Chemiluminescence ImmunoAssay). Due metodi EIA e uno CIA sono stati approvati dalla FDA americana per l'uso clinico: HCV EIA 2.0 (Abbott, Cam-poverde di Aprilia, LT); HCV Version 3.0 ELISA (Ortho, Milano); CIA Vitros Anti-HCV (Ortho).

Tutti questi test utilizzano antigeni ricombinanti. La sensibilità e specificità di questi test è intorno al 99%, ma la probabilità di ottenere falsi positivi è discretamente elevata in una popolazione di individui immunocompetenti a bassa prevalenza di epatite C; pertanto, almeno fino a qualche tempo fa, i risultati positivi allo screening andavano verificati con un test supplementare indipendente ad alta specificità (Tab. III). Il test supplementare Chiron RIBA HCV 3.0 SIA è un immunoblot su strisce di nitrocellulosa, che utilizza sia antigeni ricombinanti sia peptidi sintetici da pro-

Tabella III. Raccomandazioni CDC per la valutazione dei risultati positivi ottenuti da test EIA e CIA. www.cdc.gov/hepatitis/HCV/LabTesting.htm.

Screening test Kit	Produttore	Metodo	Indice per vero Positivo >95%
Ortho HCV Version 3.0	Ortho	EIA	>3.8
Abbott HCV EIA 2.0	Abbott	EIA	>3.8
Vitros Anti-HCV	Ortho	CIA	>8.0
AxSYM Anti-HCV	Abbott	MEIA	>10
Architect Anti-HCV	Abbott	CMIA	>5.0
ADVIA Centaur HCV	Siemens	CIA	>11

teine strutturali e non strutturali del virus. La presenza di anticorpi di tipo IgG contro antigeni virali si evidenzia in forma di bande distinte che consentono di identificarli in base alla loro reattività antigenica. Il test esclude alcuni falsi positivi ottenuti con i metodi EIA o CIA per l'interferenza di anticorpi IgG anti SOD.

I risultati si interpretano nel seguente modo:

1. *positivo*: almeno 2 bande presenti con intensità di colore uguale o superiore a quella dei controlli interni, relative indifferentemente a proteine strutturali e non strutturali;
2. *negativo*: nessuna banda;
3. *indeterminato*: 1 sola banda, relativa indifferentemente a proteine strutturali e non strutturali.

Secondo le "Guidelines for Laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus" (CDC-Atlanta USA 2003), un test sierologico anti-HCV è ritenuto:

Positivo se:

1. Screening HCVAb positivo e RIBA o NAAT sono positivi; *oppure*
2. Screening HCVAb positivo, NAAT negativo e RIBA positivo.

Negativo se:

1. Screening HCVAb negativo, *oppure*
2. Screening HCVAb positivo e RIBA negativo, *oppure*
3. Screening HCVAb positivo, RIBA negativo e NAAT negativo.

Indeterminato se:

1. Screening HCVAb positivo e RIBA indeterminato.

Un test indeterminato indica che non può essere definito lo status immunologico nei confronti di HCV. Questo accade frequentemente in campioni di siero con indice del segnale del campione/segnale del cut off borderline o leggermente superiore ai livelli soglia raccomandati dalla metodica. Anche se nella maggioranza dei casi è ragionevole pensare ad un campione negativo (falso positivo), non si può escludere che si tratti di pazienti che abbiano contratto l'infezione recentemente (nel qual caso l'HCV-RNA è positivo) oppure è traccia di una infezione cronica (nel qual caso l'HCV-RNA può essere positivo ma anche negativo); in questo caso, in mancanza di un test NAAT, è necessario ripetere il dosaggio dopo almeno 30 giorni. E' importante conoscere lo specifico s/co ratio di ciascun test commerciale per predire la vera positività del risultato, tenendo conto della prevalenza dell'infezione nella popolazione testata.

Molto recentemente è stato introdotto nella pratica clinica un nuovo test quantitativo per la ricerca di HCVAg, con tecnica CMIA (Chemiluminescent Microparticle ImmunoAssay - Abbott). Il razionale del suo utilizzo sta nel

fatto che l'antigene HCV è rilevabile molto prima degli anticorpi anti HCV. La cosiddetta finestra sierodiagnostica (virus presente in assenza di anticorpi rilevabili), può durare fino a 70 giorni in presenza di infezione da HCV; un test anticorpale negativo non esclude l'infezione in fase di incubazione. Analogamente all'HBsAg in presenza di infezione attiva da HBV, HCVAg è presente nella infezione attiva sia acuta che cronica, mentre gli anticorpi specifici non discriminano tra infezione acuta o cronica né la loro presenza indica l'avvenuta eliminazione del virus dall'organismo.

Le indicazioni al test HCV Ag sono pertanto:

- la conferma di campioni positivi al test HCVAb
- la distinzione di infezione pregressa da quella in atto
- lo screening di pazienti ad elevato rischio di infezione (dializzati, immunosoppressi, tossicodipendenti)
- test aggiuntivo nel monitoraggio della terapia.

Esami molecolari (NAATs)^{12,13}

Gli esami molecolari qualitativi sono sempre stati più sensibili di quelli quantitativi; con la recente disponibilità di metodiche quantitative ad alta sensibilità come la *Real time* PCR e la TMA (*Transcription Mediated Amplification*), che raggiungono sensibilità analitiche di 10-50 IU/mL, le metodiche qualitative non risultano più necessarie per un appropriato monitoraggio della terapia antivirale (Tab. IV). Tutti i metodi disponibili mostrano una eccellente specificità (98%-99%).

Gli esami molecolari vengono comunemente utilizzati nella pratica clinica per la diagnosi di epatite C acuta e cronica e per la valutazione ed il monitoraggio dei pazienti affetti da epatite cronica.

Un esame NAAT negativo successivo ad uno screening sierologico positivo è usualmente indicativo

di risoluzione dell'infezione. In circa il 15%-20% dei casi di persone HCVAb⁺ che hanno acquisito l'infezione in età matura (>45 anni) la malattia guarisce spontaneamente; questa proporzione è più alta (40%-45%) se l'infezione è contratta nell'infanzia o nell'adolescenza. Per determinare se l'infezione da HCV è risolta sono necessari ripetuti risultati negativi per la ricerca dell'RNA virale e un tale follow-up è indicato solo per individui con HCVAb⁺ sierologicamente confermato.

E' anche importante sottolineare che, nelle infezioni croniche, sono possibili viremie intermittenti o di basso livello e per questa ragione i clinici, in questo contesto, dovrebbero richiedere un secondo esame NAAT dopo 6-12 mesi, se il primo fosse risultato negativo. In aggiunta, i pazienti con esposizione ripetuta negli anni possono anche re-in-

Tabella IV. Test commerciali disponibili per la quantificazione di HCV nel siero/plasma. Da: Diagnosis, management and treatment of hepatitis C: an update. Hepatology April 2009 (modificato).

Test/Produttore	Metodo	IU/mL fattore di conversione	Range dinamico IU/mL
Amplicor HCV Monitor (Roche)	RT PCR Manuale	0.9 copie/mL	600 – 500.000
Cobas Amplicor HCV Monitor v.2.0 (Roche)	RT PCR Semiautomatico	2.7 copie/mL	600 – 500.000
Versant HCV RNA 3.0 Assay (bDNA) (Siemens)	Ampl.segnale Semiautomatico	5.2 copie/mL	615 – 7.700.000
LCx HCV RNA Quantitative Assay (Abbott)	RT PCR Semiautomatico	3.8 copie/mL	25 – 2.630.000
SuperQuant (NGI)	RT PCR Semiautomatico	3.4 copie/mL	30 – 1.470.000
Cobas TaqMan HCV (Roche)	RT PCR Semiautomatico		25 – 390.000.000
Abbott Real Time	RT PCR Semiautomatico		12 – 100.000.000

fettarsi. In contesti di ricerca clinica, metodiche NAAT applicate su materiali diversi da siero o plasma, hanno contribuito a fornire dati a favore del controverso tema dell'esistenza della epatite C "occulta".

Esami genotipici

Il genoma del virus C è altamente variabile: viene classificato in 6 gruppi di genotipi maggiori, o cladi, contrassegnati da numeri, e in numerosi sottotipi contrassegnati da lettere in base all'analisi filogenetica della sequenza genomica. Questi gruppi di genotipi differiscono del 31%-34% a livello di posizioni di sequenze nucleotidiche e di circa il 30% in termini di posizioni di sequenze aminoacidiche. La scelta della regione da sottoporre ad amplificazione per la tipizzazione del genoma è ancora oggetto di discussione. Infatti, l'impiego della sola regione altamente conservata 5'-UTR produce risultati soddisfacenti per l'identificazione dei genotipi maggiori (< 3% di genotipizzazioni non corrette), mentre nel 5%-8% dei casi molti sottotipi non possono essere distinti in modo affidabile a causa delle mutazioni puntiformi che intervengono in questa regione.

Diversi sono i metodi commerciali che consentono la genotipizzazione con tecnica di *reverse hybridization* tramite sonde oligonucleotidiche specifiche per la regione 5'-UTR (Trugene 5'NC HCV Genotyping – Siemens, Milano), INNO-LiPa HCV II – Innogenetics, Versant HCV Genotyping Assay 2.0 (Siemens). La tipizzazione è un'indagine molto importante e va garantita ad ogni paziente da avviare protocollo terapeutico in quanto consente di:

- valutare l'associazione del genotipo con differenti decorso clinici nelle epatopatie da HCV
- predire le probabilità di risposta alla terapia anti virale
- condizionarne la durata della stessa
- determinare il dosaggio dei farmaci.

Operatori sanitari ed epatiti virali "blood borne"¹⁴⁻¹⁶

Tutti gli operatori sanitari a rischio di esposizione a san-

gue e/o fluidi biologici dovrebbero essere sottoposti a vaccinazione contro il virus dell'epatite B e, a tutti, dovrebbe essere offerto l'esame HBsAb quantitativo 1-2 mesi dopo l'ultima dose di vaccino. Persone immunocompetenti che presentano HBsAb circolante in concentrazioni maggiori di 10 IU/L (cosiddetti *responders*) non necessitano di ulteriori vaccinazioni o profilassi con HBIG neanche in caso di esposizione accertata. Evidenze scientifiche dimostrano che i *responders* sono protetti dall'infezione per più di 20 anni, anche se, nel tempo, i livelli circolanti di HBsAb possono drasticamente diminuire. Il monitoraggio negli anni della concentrazione di HBsAb non è raccomandato nei soggetti *responders*.

Se dopo un primo ciclo vaccinale l'HBsAb è negativo o presenta una concentrazione sierica inferiore alle 10 IU/L, l'intero protocollo dovrebbe essere ripetuto, compreso un nuovo dosaggio di HBsAb. Soggetti ancora sieronegativi dopo la seconda vaccinazione vanno considerati come *non responders* e andrebbero testati per HBsAg, al fine di escludere un'infezione cronica da HBV; gli individui positivi devono ricevere appropriati counselling e terapie mediche mentre quelli negativi sono da considerare suscettibili all'infezione e devono essere sottoposti a profilassi con Immunoglobuline (HBIG) in ogni caso di possibile esposizione a sangue. I soggetti immunocompromessi devono essere testati periodicamente per HBsAb ed eventualmente sottoposti a dosi booster di vaccino per mantenere la concentrazione almeno intorno a 10 U/L.

Gli esami per HCV sono raccomandati per tutti gli esposti a rischio aumentato di infezione, tra cui gli operatori sanitari esposti alla puntura di aghi o lesione con taglienti e dopo un incidente con un materiale ematico HCV positivo o ignoto. Le frequenze misurate di trasmissione di HCV da operatori sanitari sono generalmente molto basse, ma non negative. I casi dimostrati sono aneddotici ma non assenti. Qualcuno stima un rischio fino a 10 volte quello della popolazione generale, altri lo paragonano a quello di una trasfusione di sangue. Il rischio sembra dipendere so-

prattutto dall'entità della viremia (Yazdanpanah 2006). Inoltre il rischio può variare molto da un paese all'altro, verosimilmente in relazione alle condizioni socio economiche generali ed alle prassi sanitarie. Fatto sta che in molti servizi immunotrasfusionali la semplice presenza nella storia recente di cure dentarie è sufficiente per sospendere il donatore, almeno per un certo periodo, variabile da qualche giorno a qualche settimana. Si discute molto sull'opportunità di escludere o meno gli operatori HCV positivi da procedure a rischio di trasmissione di patogeni ematogeni e/o di offrire loro una terapia antivirale specifica. La questione, come si può intuire, è molto delicata ed ha molteplici implicazioni, ad oggi non si può dire definitivamente risolta. Nelle linee guida scozzesi, la presenza di HCV RNA comporta l'esclusione degli operatori infetti dalle prestazioni a rischio e persino dal percorso formativo per prestazioni a rischio. Per lo stesso principio, se dopo terapia l'operatore diventa HCV RNA negativo può essere riammesso alle attività ed alla formazione.

A nostro parere, non va trascurato l'effetto di sensibilizzazione, per così dire "educativo", che possono avere le misure di sorveglianza sanitaria anche attraverso esami di laboratorio, allo scopo di ricordare la permanenza del rischio e la necessità delle misure preventive. E' infatti dimostrato che molti operatori non hanno una percezione adeguata del rischio a cui sono esposti ed a cui espongono i pazienti. La situazione normativa in Italia non è proprio chiarissima.

I riferimenti base si trovano nel decreto legislativo 9 aprile 2008, n. 81 - Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. Oltre agli articoli generali 17 e 28 (obbligo alla valutazione dei rischi ed oggetto della valutazione dei rischi), sono precisamente riferiti al rischio biologico gli articoli 271 e seguenti fino al 279. Numerosi passaggi della legge si prestano ad interpretazioni ambigue, poco chiare. Il comma 4 art. 271 ammette la possibilità che i risultati della valutazione dei rischi dimostrino che la sorveglianza sanitaria non è necessaria. Una lettura superficiale di questi passaggi sta portando molti operatori, specialmente tra i professionisti privati, ad escludere la sorveglianza, gli esami di monitoraggio e l'attività del medico del lavoro (c.d. "medico competente"). E' vero peraltro che nello stesso decreto si definisce come valutazione dei rischi (art. 2) non una semplice e lapidaria dichiarazione, bensì "... valutazione globale e documentata di tutti i rischi per la salute e sicurezza dei lavoratori presenti nell'ambito dell'organizzazione in cui essi prestano la propria attività, finalizzata ad individuare le adeguate misure di prevenzione e di protezione e ad elaborare il programma delle misure atte a garantire il miglioramento nel tempo dei livelli di salute e sicurezza;...", a cui si aggiungono l'articolo 2 (che dispone di inserire nella valutazione "...l'indicazione delle misure di prevenzione e di protezione attuate e dei dispositivi di protezione individuali adottati...") e l'articolo 271 comma 5 dove nel si prescrive di inserire documento di valutazione dei rischi "...d) i metodi e le procedure lavorative adottate, nonché le misure preventive e protettive applicate; ...". La sorveglianza sanitaria viene prevista (art. 41) "...a) nei casi previsti dalla normativa vigente, dalle direttive europee nonché dalle indicazioni

fornite dalla Commissione consultiva di cui all'articolo 6;...". Le indicazioni della Commissione ex art. 6 non esistono ancora, ma le Direttive europee invece sì, poiché si trovano nella *Directive 2000/54/EC Of The European Parliament And Of The Council Of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC)*.

Vale la pena di notare infine che la legge 3 Agosto 2007, n. 123 Misure in tema di tutela della salute e della sicurezza sul lavoro e delega al Governo per il riassetto e la riforma della normativa in materia, quella su cui si basa il decreto 81, stabilisce che "3. 1 decreti di cui al presente articolo non possono disporre un abbassamento dei livelli di protezione, di sicurezza e di tutela...". Vale la pena infine di ricordare che la violazione delle norme del decreto 81/2008 comporta sanzioni penali (art. 55), così come evidentemente una sottovalutazione dei rischi tale da causare lesioni personali (epatite) o addirittura un decesso colposo si pone in relazione agli articoli 589 e 590 del codice penale. Il pubblico ufficiale ha l'obbligo di segnalazione (C.P art. 361).

Considerazioni conclusive

Si è cercato in questa sintetica rassegna di dare conto delle più importanti novità in questo affascinante campo della Infettivologia. Come si accennava in premessa, l'interesse della comunità scientifica per le tematiche connesse all'infezione dei virus epatitici non accenna affatto a diminuire, anzi, si alimenta di giorno in giorno di nuove scoperte ed importanti implementazioni. L'altro lato della medaglia è rappresentato dal notevole, proporzionale aumento della complessità interpretativa di tutti questi elementi. Ma proprio dove aumenta la complessità entra in gioco la capacità di governo della professione. Questo specifico settore appare un terreno ideale per dimostrare a pieno il grande valore della Medicina di Laboratorio nel garantire una assistenza sanitaria in linea con quanto richiedono i tempi: ottenere il massimo dell'efficacia clinica nel rispetto della dignità e delle preferenze del paziente e con un occhio responsabile al consumo di risorse preziose e non infinite.

Bibliografia

1. Dienstag JL. Hepatitis B Virus Infection. N Engl J Med 2008; 359:1486-500.
2. Weinbaum CM, Williams I, Mast EE, Wang SA, Finelli L, Wasley A, et al. Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis B virus infections. MMWR Recomm Rep 2008; 57:1-20.
3. Viral Hepatitis Testing Guidelines and Protocols Advisory Committee. Health Canada Primary Health Care. Disponibile su: URL: www.healthservices.gov.bc.ca/msp/protoguides (data consultazione: 10.8.2010).
4. Interpretation of Hepatitis B serologic test results. Disponibile su: URL: www.cdc.gov/hepatitis/HBV/LabTesting.htm (data consultazione: 22.7.2010).
5. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. Hepatology 2009; 50:661-2.
6. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 426-39.
7. van Hemert FJ, Zaaijer HL, Berkhout B, Lukashov VV. Occult

- hepatitis B infection: an evolutionary scenario. *Virology* 2008; 5:146.
8. Dufour DR, Talastas M, Fernandez MD, Harris B, Strader DB, Seeff LB. Low-positive anti-hepatitis C virus enzyme immunoassay results: an important predictor of low likelihood of hepatitis C infections. *Clin Chem* 2003; 49:479-86.
 9. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L; Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. *MMWR Recomm Rep* 2003; 52:1-13.
 10. Ross RS, Viazov S, Salloum S, Hilgard P, Gerken G, Roggen-dorf M. Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1161-8.
 11. Hepatitis C Information for Health Professionals. Laboratory testing. Disponibile su: URL: <http://www.cdc.gov/hepatitis/HCV/LabTesting.htm> (data consultazione: 22.7.2010).
 12. Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review *JAMA* 2007; 297:724-32.
 13. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff L; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; 49:1335-74.
 14. Francois G. Hepatitis B, hepatitis C, and other blood-borne infections in healthcare workers viral hepatitis prevention board. Meeting, Rome, Italy, 2005, March 17-18.
 15. Hepatitis C Infected Health Care Workers. Disponibile su: URL: <http://www.scotland.gov.uk/Publications/2002/11/15811/13927> e <http://www.scotland.gov.uk/Publications/2002/11/15811/13928> (data consultazione: 10.8.2010)
 16. Kohn WG, Collins AS, Cleveland JL, Harte JA, Eklund KJ, Malvitz DM; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for infection control in dental health-care settings-2003. *MMWR Recomm Rep* 2003; 52:1-61.