

Quantificazione HBV-RNA per il monitoraggio dell'infezione cronica da HBV.

Greta Roncarati¹, Tiziano Ferniani², Silvia Galli¹, Tiziana Lazzarotto^{1,2}

¹UOC Microbiologia, IRCSS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna

²Microbiologia, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche-DIMEC, Alma Mater Studiorum Università di Bologna

Introduzione

L'epatite cronica B (CHB) causata dal Virus dell'Epatite B (HBV) è ancora oggi un grave problema di salute pubblica che colpisce circa 296 milioni di persone in tutto il mondo (WHO, 2019).

Sebbene i farmaci antivirali di prima linea come gli NA (analoghi nucleosidici o nucleotidici) possono inibire efficientemente la replicazione del virus e controllare la progressione verso la malattia, questi farmaci però raramente portano all'eliminazione dell'infezione cronica da HBV a causa del loro scarso effetto sul cccDNA (*covalently closed circular DNA*) di HBV che rimane come molecola episomale attiva nel nucleo degli epatociti.

Attualmente, il monitoraggio del cccDNA virale intraepatico non è di facile esecuzione e non sono disponibili ancora metodiche standardizzate per il suo rilevamento (Rousselet 2005, Bravo 2001). Per questo motivo, la ricerca clinica in questi ultimi anni, si è orientata nel cercare di identificare altri marcatori plasmatici HBV-specifici che possano essere correlati con l'attività replicativa virale intraepatica. In particolare, alcuni studi presenti in letteratura suggeriscono che la ricerca nel plasma di molecole di RNA virale pregenomico (pgRNA) possa essere un valido e preciso strumento per monitorare l'attività trascrizionale del cccDNA di HBV.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare i livelli plasmatici di pgRNA del virus in pazienti con infezione/malattia cronica da HBV allo scopo di migliorare la classificazione e la loro gestione diagnostico-assistenziale.

Materiale e Metodi

Lo studio ha previsto l'arruolamento di 305 pazienti positivi per HBsAg (Antigene S di HBV) da più di sei mesi e si è realizzato attraverso due fasi: nella prima fase sono stati valutati retrospettivamente campioni di plasma provenienti da 159 pazienti HBeAg-negativi (Antigene E di HBV), dei quali 85 con CHB e 74 con infezione virale cronica (CIB). La seconda fase invece, ha previsto l'arruolamento prospettico di 146 pazienti con diagnosi di infezioni cronica da HBV.

I criteri di esclusione sono stati i seguenti: (i) età < 18 anni; (ii) gravidanza; (iii) concomitante coinfezione con altri virus epatotropi primari; (iv) altre cause di malattia epatica come la malattia alcolica o autoimmune o metabolica.

In ciascun paziente sono stati raccolti campioni sequenziali di plasma durante le visite, previste dall'iter diagnostico. In corso di infezione/malattia cronica da HBV, i pazienti vengono classificati in 5 categorie associate alle 5 fasi che riflettono la relazione dinamica tra replicazione virale e risposta immunitaria dell'ospite. Ciascuna categoria è definita da criteri clinici, dai risultati dei test biochimici [transaminasi] e virologici [antigeni S ed E di HBV e livelli di HBV-DNA], in accordo con le linee guida pubblicate dall'European Association for the Study of the Liver (EASL 2017).

La valutazione dei livelli plasmatici di HBV-pgRNA è stata eseguita con una RT-qPCR (Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) *homemade* allestita presso il laboratorio Virus dell'Epatiti primarie della UOC di Microbiologia.

Risultati

Sono stati analizzati i risultati ottenuti dai 159 pazienti HBeAg-negativi dei quali, 85 pazienti CHB presentavano livelli di HBV-DNA ≥ 2000 IU/ml e 67 su 74 pazienti CIB presentavano livelli di HBV-DNA < 2000 IU/ml. Analizzando i livelli di HBV-pgRNA, è stata riscontrata una differenza significativa tra i due gruppi CHB e CIB (mediana 5,62 Log copie/mL vs copie/mL non rilevabili, rispettivamente, $P < 0,001$).

In ambedue i gruppi di pazienti, i risultati quantitativi di pgRNA correlavano moderatamente con i livelli di HBsAg (Spearman $r = 0,469$ $P < 0,001$ e Spearman $r = 0,303$ $P < 0,001$, rispettivamente), erano invece maggiormente correlati con i livelli di HBV-DNA (Spearman $r = 0,742$ $P < 0,001$ e Spearman $r = 0,732$ $P < 0,001$, rispettivamente).

Dei 146 pazienti seguiti in modo prospettico, a 10 è stata diagnosticata una CHB (4 erano HBeAg-positivi e 6 HBeAg-negativi), a 80 è stata accertata una CIB (5 erano HBeAg-positivi e 75 HBeAg-negativi) e nei restanti 56 pazienti è stata riconosciuta, durante il monitoraggio, la perdita di positività all'HBsAg.

Nel complesso, nei 146 pazienti, è stato osservato come i livelli di pgRNA erano correlati moderatamente sia con HBV-DNA (Spearman $r=0.30$ $P<0.001$), sia con HBsAg (Spearman $r=0.32$ $P<0.001$) e sia con l'aumento delle transaminasi (Spearman $r=0.26$ $P<0.001$).

È importante però sottolineare che i livelli di pgRNA erano molto più elevati nel gruppo di pazienti positivi per l'Antigene E di HBV rispetto ai pazienti HBeAg-negativi e la differenza è risultata statisticamente significativa ($P<0.001$). Inoltre, i livelli di pgRNA nei 9 pazienti con Antigene E positivo, erano correlati con i carichi elevati di HBV-DNA e di HBsAg (Spearman $r=0.70$ $P<0.001$ e Spearman $r=0.62$ $P<0.001$, rispettivamente).

Infine, negli 81 pazienti HBeAg-negativi, le molecole di pgRNA erano presenti quasi esclusivamente nei campioni di plasma dei pazienti con CHB e solo in questo gruppo è stata osservata una moderata correlazione tra i livelli di pgRNA e di HBV-DNA (Spearman $r=0.44$ $P=0.002$).

In tutti i campioni di plasma ottenuti dai 56 pazienti che hanno perso durante il follow-up l'HBsAg, non sono state identificate molecole di pgRNA e di HBV-DNA.

Discussione

Complessivamente, nel gruppo di pazienti con CHB è emersa una buona correlazione tra i livelli di pgRNA di HBV e i tradizionali marcatori virologici (HBsAg, HBeAg e HBV-DNA) e marcatori biochimici (transaminasi) in accordo con i dati presenti in letteratura.

Sono state osservate differenze significative dei livelli di pgRNA tra i pazienti HBeAg positivi e negativi, tra i pazienti CHB e CIB con HBeAg negativo, confermando l'utilità di questo marcatore per identificare correttamente i portatori inattivi di HBV, cioè soggetti HBsAg positivi, ma con una bassa attività replicativa, cioè bassi livelli di viremia (HBV-DNA) nel sangue (Riveiro-Barcié 2021; Liu 2019). Infine, la valutazione dei livelli di pgRNA di HBV potrebbe permettere una più corretta classificazione dei soggetti con quadri complessi di CHB e CIB.

I risultati ottenuti nel nostro studio sono molto incoraggianti e in accordo con la letteratura, è importante comunque sottolineare che lo studio deve proseguire per aumentare il numero dei pazienti con infezioni/malattie epatiche croniche e complesse da HBV allo scopo di confermare le osservazioni ottenute da questi primi risultati preliminari. Infine, sarebbe importante standardizzare la metodica molecolare che ci permette di identificare e quantificare le molecole di HBV-pgRNA.

Referenze.

Bravo AA, Sheth SG. S. C. Liver biopsy. *N Engl J Med.* 2001; 344:495–500.

Liu Y, Jiang M, Xue J, et al. Serum HBV RNA quantification: useful for monitoring natural history of chronic hepatitis B infection. *BMC Gastroenterol.* 2019; 19:53.

Riveiro-Barciela M, Pericàs JM, Buti M. How to interpret viral markers in the management of chronic hepatitis B infection. *Clin Microbiol Infect.* 2022 Mar;28(3):355-361.

Rousselet MC, Dupré F, Croué A, et al. Sources of variability in histological scoring of chronic viral hepatitis. *Hepatology.* 2005;41(2):257–264.

Testoni B, Lebossé F, Scholtes C, et. al. Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients. *J Hepatol.* 2019 Apr;70(4):615-625.

Wang J, Yu Y, Li G, et al. Natural history of serum HBV-RNA in chronic HBV infection. *J Viral Hepat.* 2018 Sep;25(9):1038-1047.

WHO (World Health Organization), Publication date: 18 July 2023, <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/hepatitis-b>.