

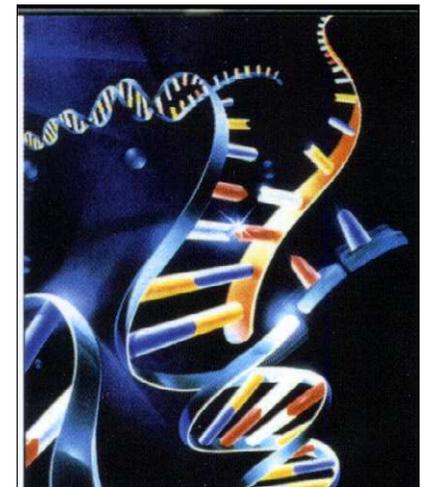
# Le tecniche molecolari nella diagnosi delle epatiti

dott. Danila Bassetti

Microbiologia e Virologia

Struttura Semplice Sierologia Autoimmunità

Ospedale S.Chiera di Trento



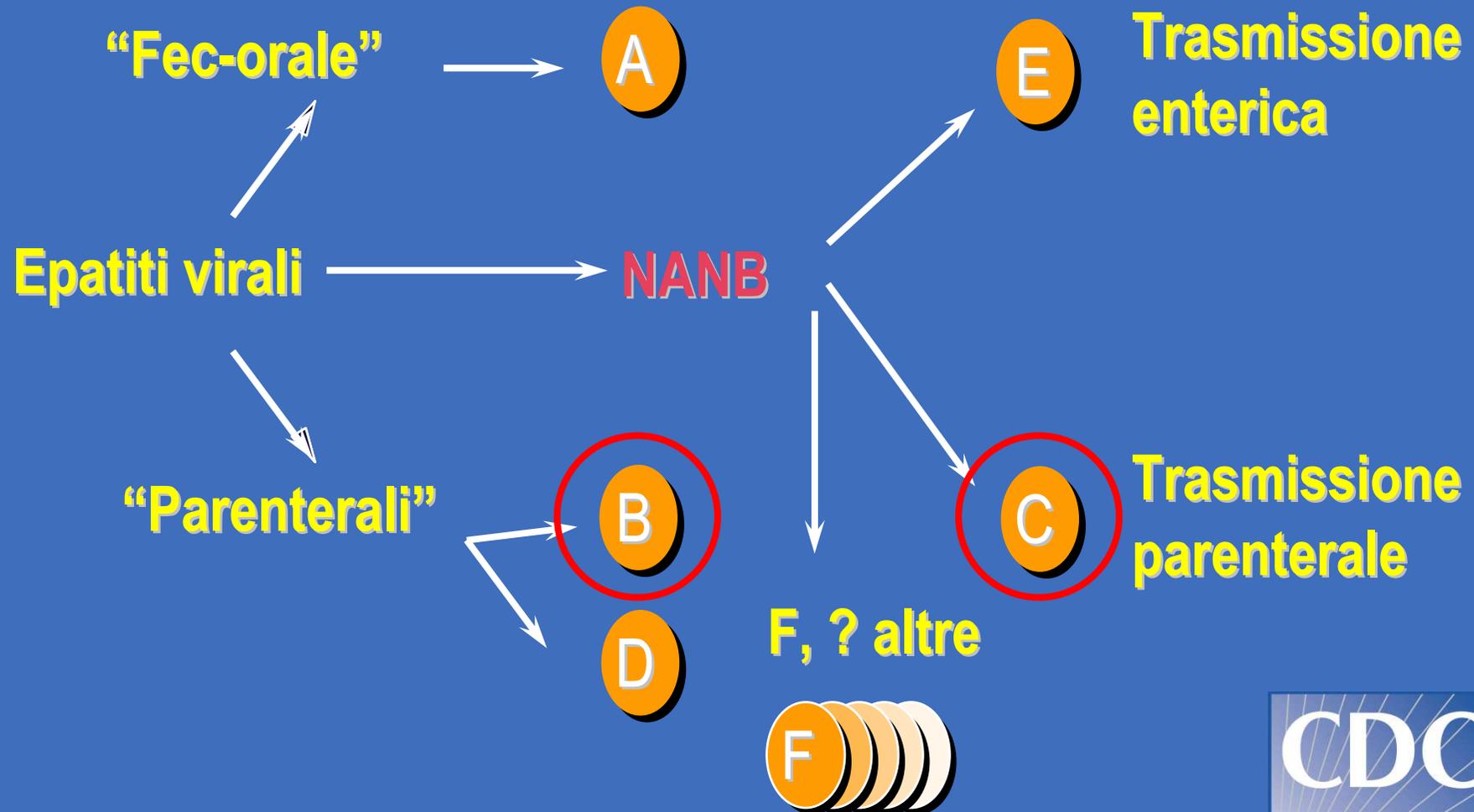
# Biologia Molecolare ed Epatiti

Integrazione nella loro gestione clinica con finalità di:

- ❑ Diagnosi delle forme acute e croniche
- ❑ Prognosi e predittività dell'efficacia terapeutica
- ❑ Monitoraggio clinico e terapeutico



## Epatiti virali - Vie di trasmissione





# Clinica epatiti B e C: variabili influenti

## Virus:

- Attività replicativa
- “Viral load”
- Genotipo
- Mutazioni da ceppo “wild type”
- Resistenza a farmaci anti-virali

## Paziente:

- Età (sesso)
- Immunodepressione
- Gravidanza
- Trasmissione verticale
- Comorbidità
- Genetica (IL28R, IFN  $\lambda$ )
- Insulinoresistenza

# Biologia Molecolare ed epatiti B / C

QUANDO  
?

COME  
?

PERCHE'  
?

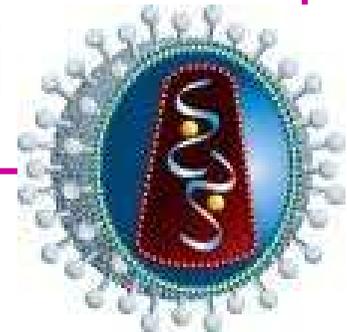
Forme ACUTE

Forme CRONICHE

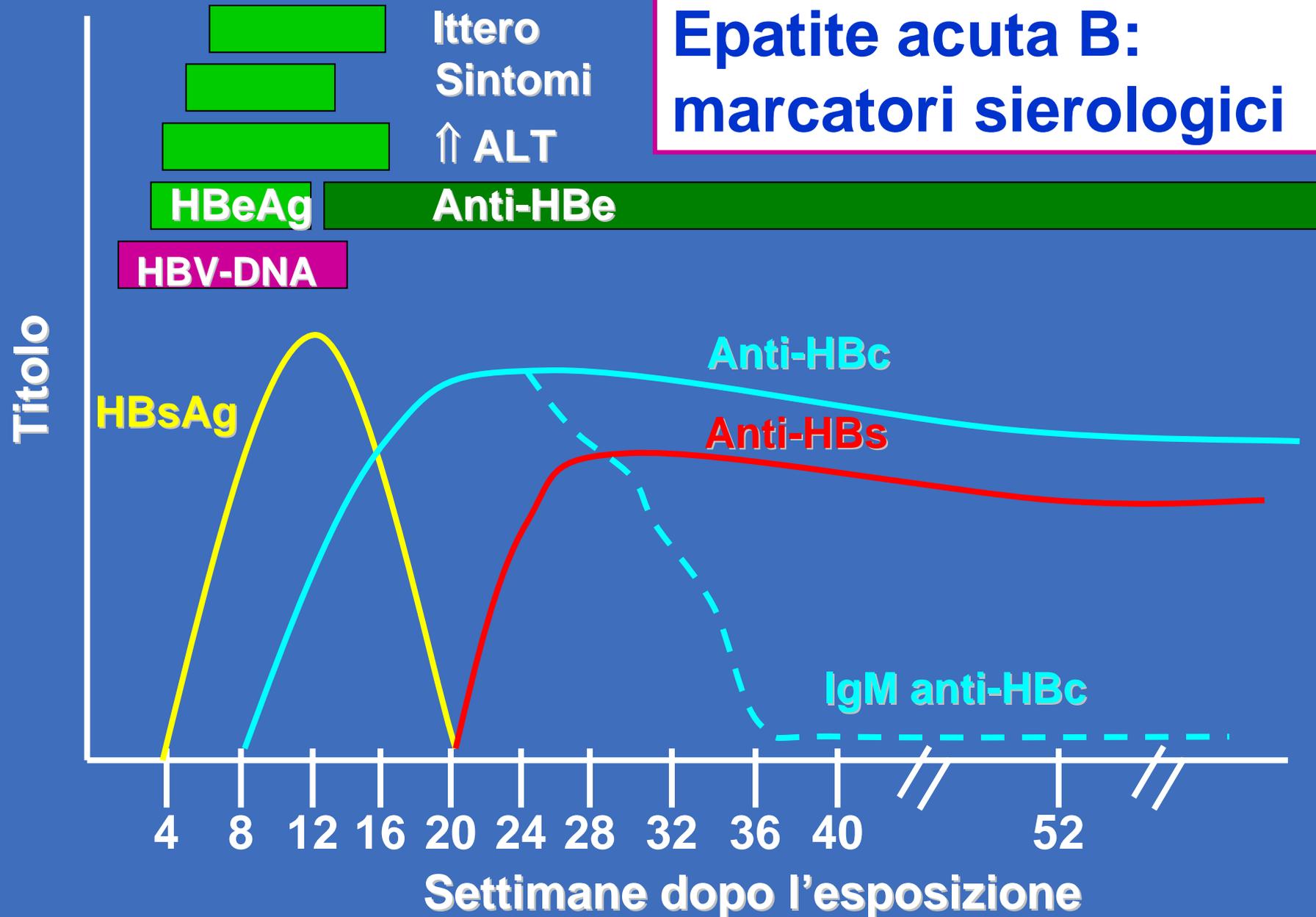


# HBV e Biologia Molecolare

- (HBV-DNA qualitativo)
- HBV-DNA quantitativo (*“viral load”*)
- Ricerca mutanti o varianti *“escape”*
- Genotipizzazione
- Ricerca resistenze ad antivirali

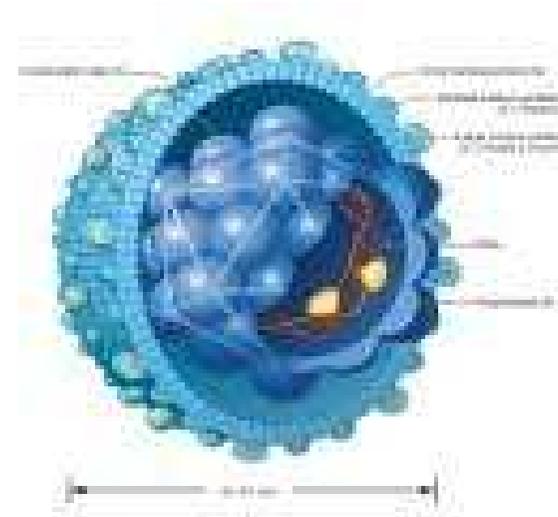


## Epatite acuta B: marcatori sierologici



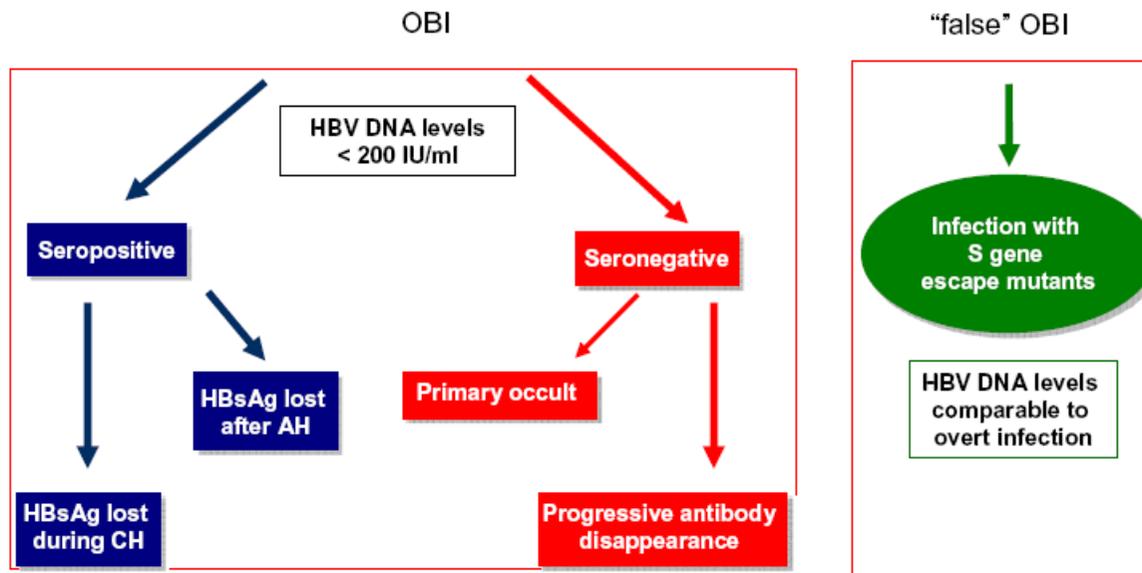
## Biologia Molecolare ed Epatite B acuta

- ❑ Generalmente non necessaria
- ❑ Utile nella identificazione di:
  - varianti HBV “escape”
  - forme c.d. Occulte



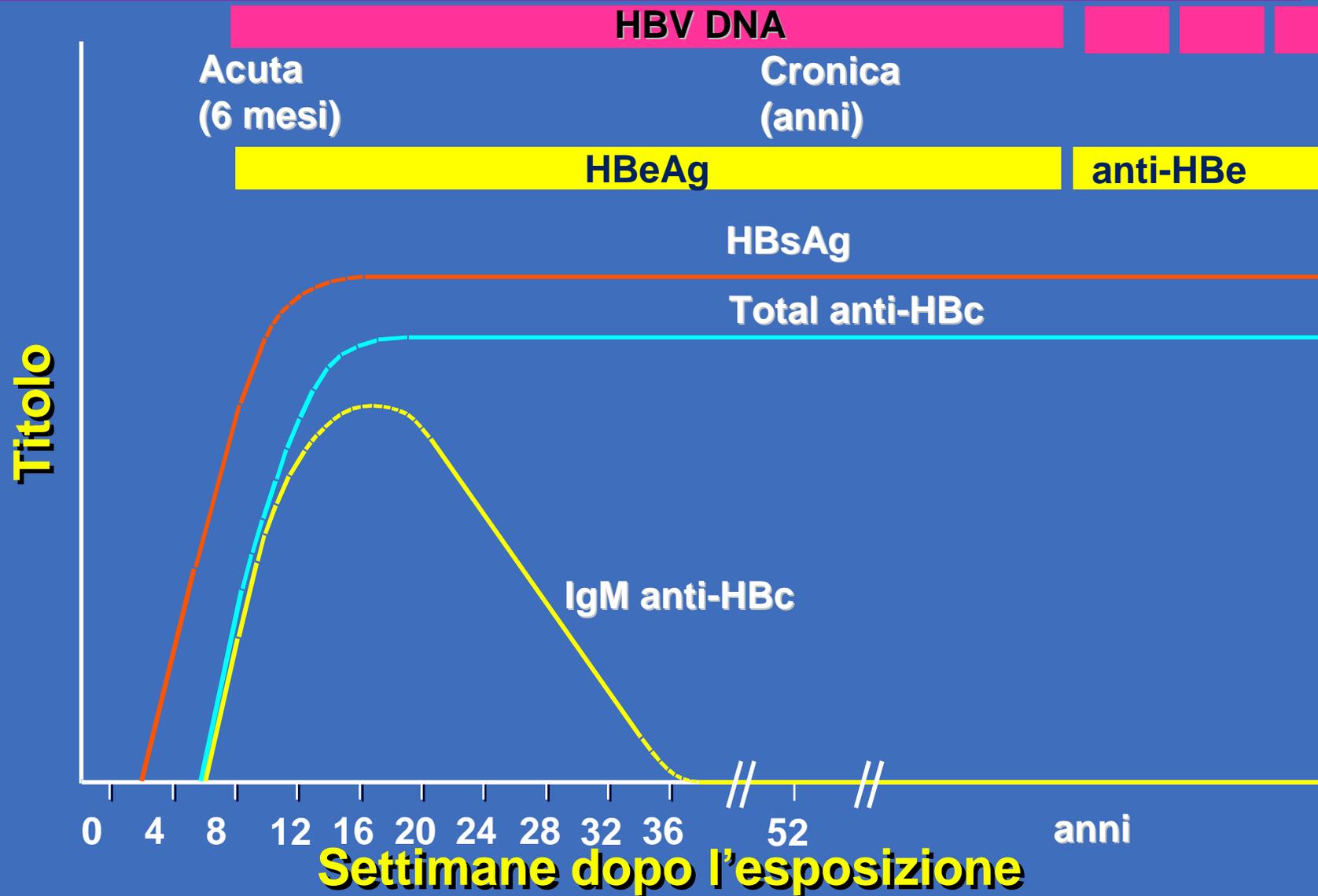
# OBI (Occult B Infection) Vero e Falso portatore occulto di HBV

G. Raimondo et al, J Hepatol 2008



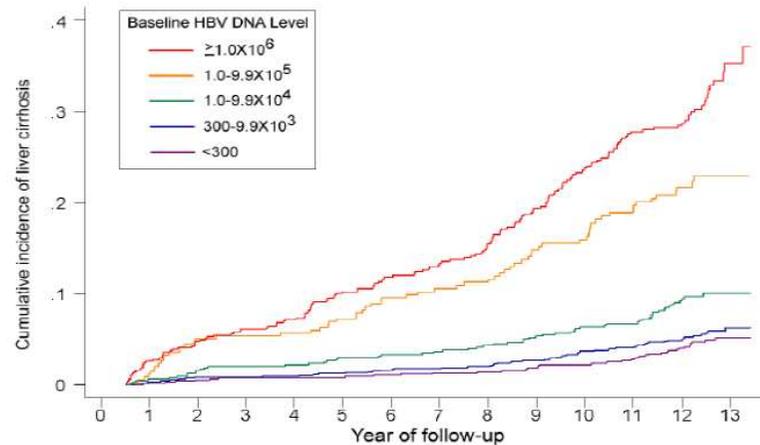


# Cronicizzazione: decorso sierologico tipico



# HBV-DNA: indicatore prognostico

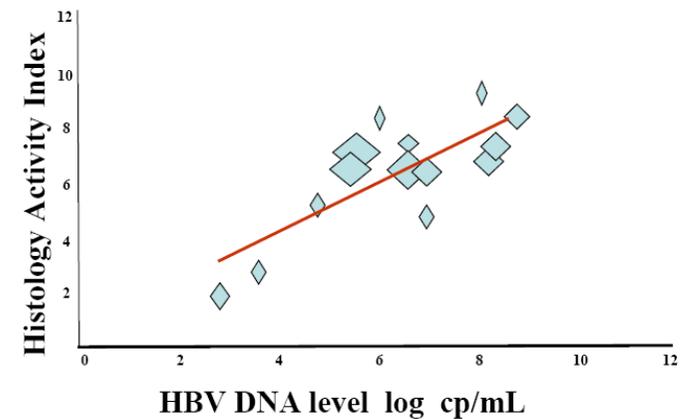
## Relazione tra livelli di HBV DNA e sviluppo di cirrosi



Iloeje, *Gastroenterology* 2006

## Relazione tra livelli di HBV DNA e indice di attività istologica.

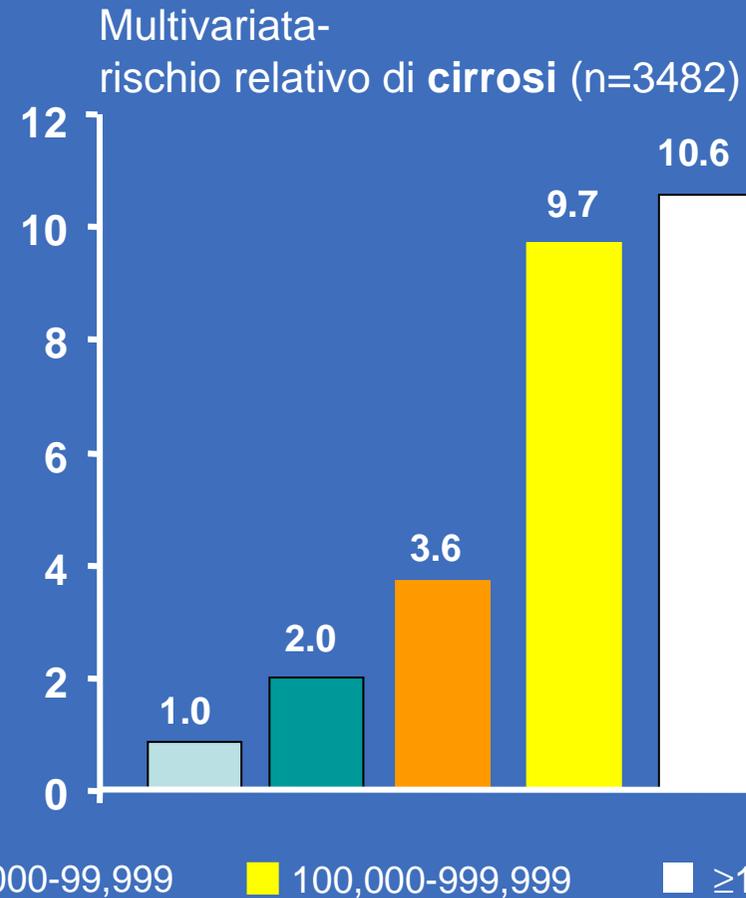
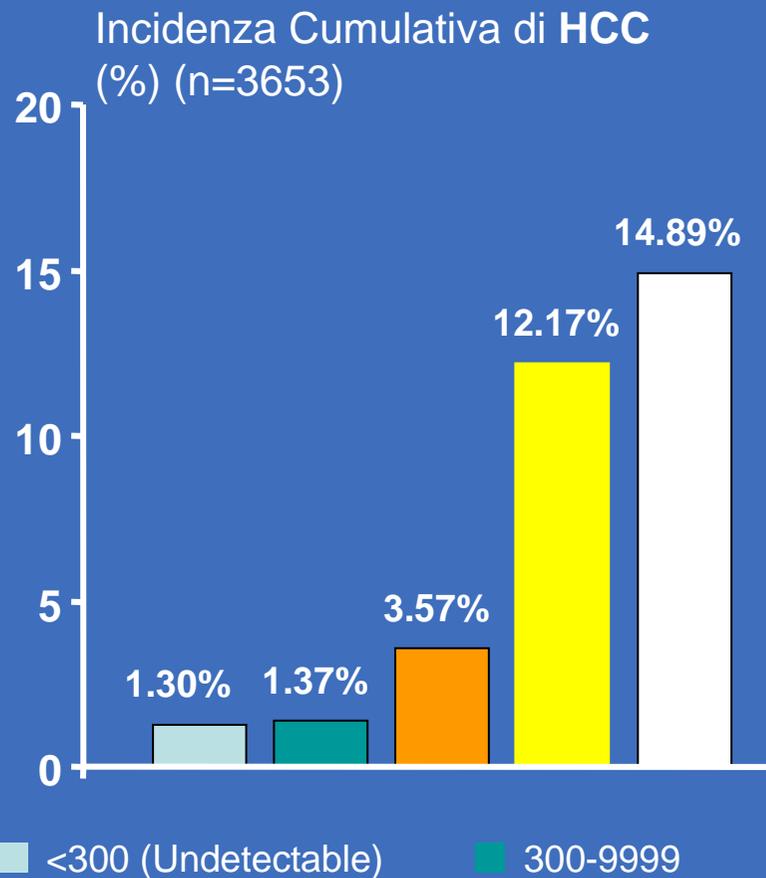
Una review di 26 studi prospettici



From: Mommeja-Marin H, *Hepatology*. 2003.

# REVEAL Studio: Livelli HBV DNA ed evoluzione

## Viral Load at Baseline



Chen CJ et al. *JAMA*. 2006;295:65-73.

Iloeje UH et al. *Gastroenterology*. 2006;130:678-686.

# Distribuzione genotipi HBV



**Cronicizza A>D**

**Pre core mutazione B,C,D>A**

**HBeAg sieroconv B versus C**

**Rischio fibrosi C>B**

**Rischio mortalità F>A o D**

**Risposta a IFN A>D, B>C**

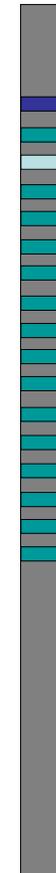
# Genotipizzazione HBV

- **Genotipo C**
  - Più spesso associato con malattia epatica severa e HCC rispetto al genotipo B
- **Genotipo B**
  - Associato con sieroconversione da HBeAg ad anti-HBe in età più giovane rispetto al genotipo C
- **Genotipi A e B**
  - Più alto tasso di risposta antivirale e perdita HBeAg in seguito a terapia con pegIFN alfa rispetto al genotipo D e C

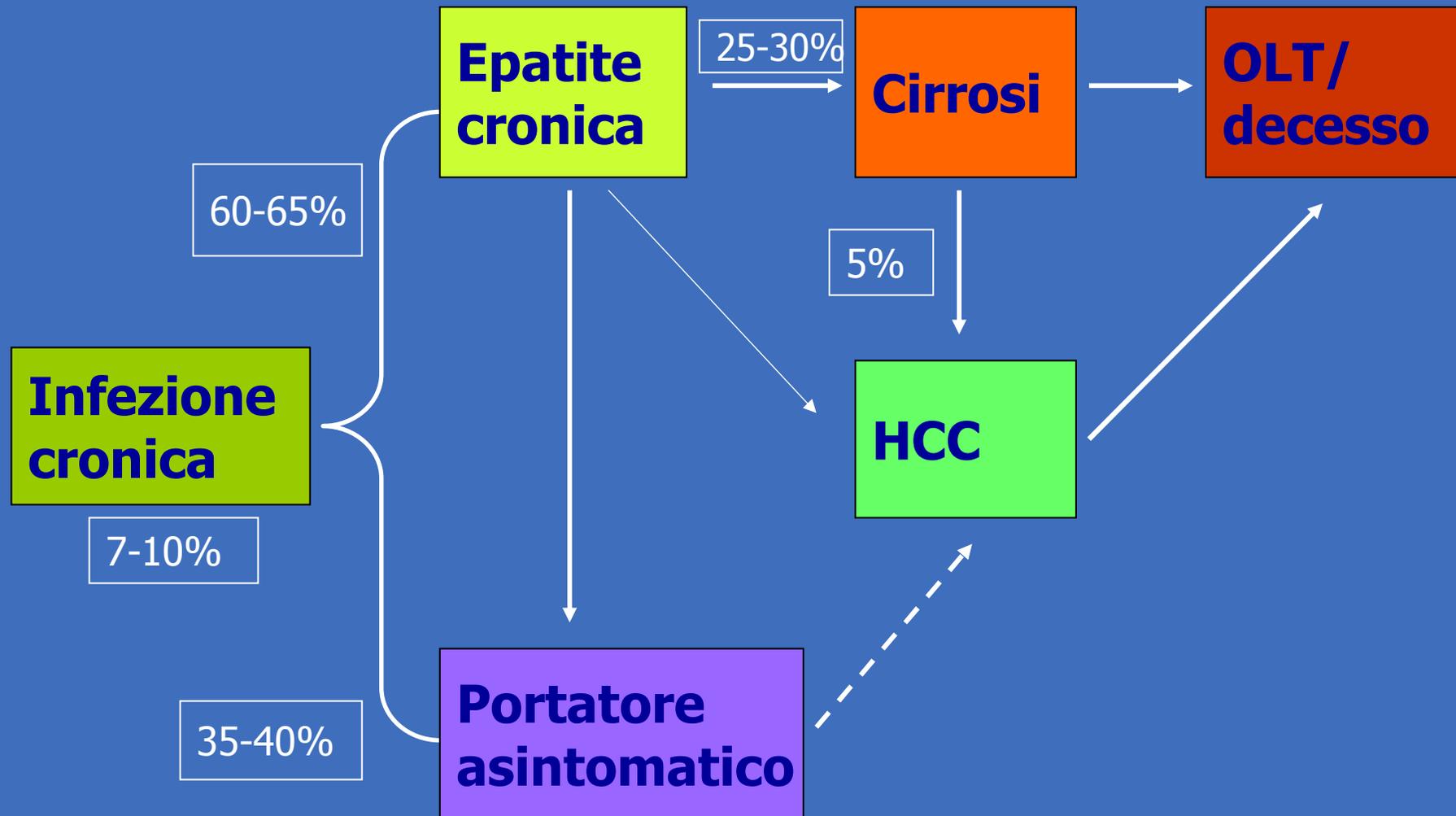
*Keefe EB, et al. Clin Gastroenterol Hepatol. 2006;4:936-962.*

## HBV Genotyping Line Probe Assay

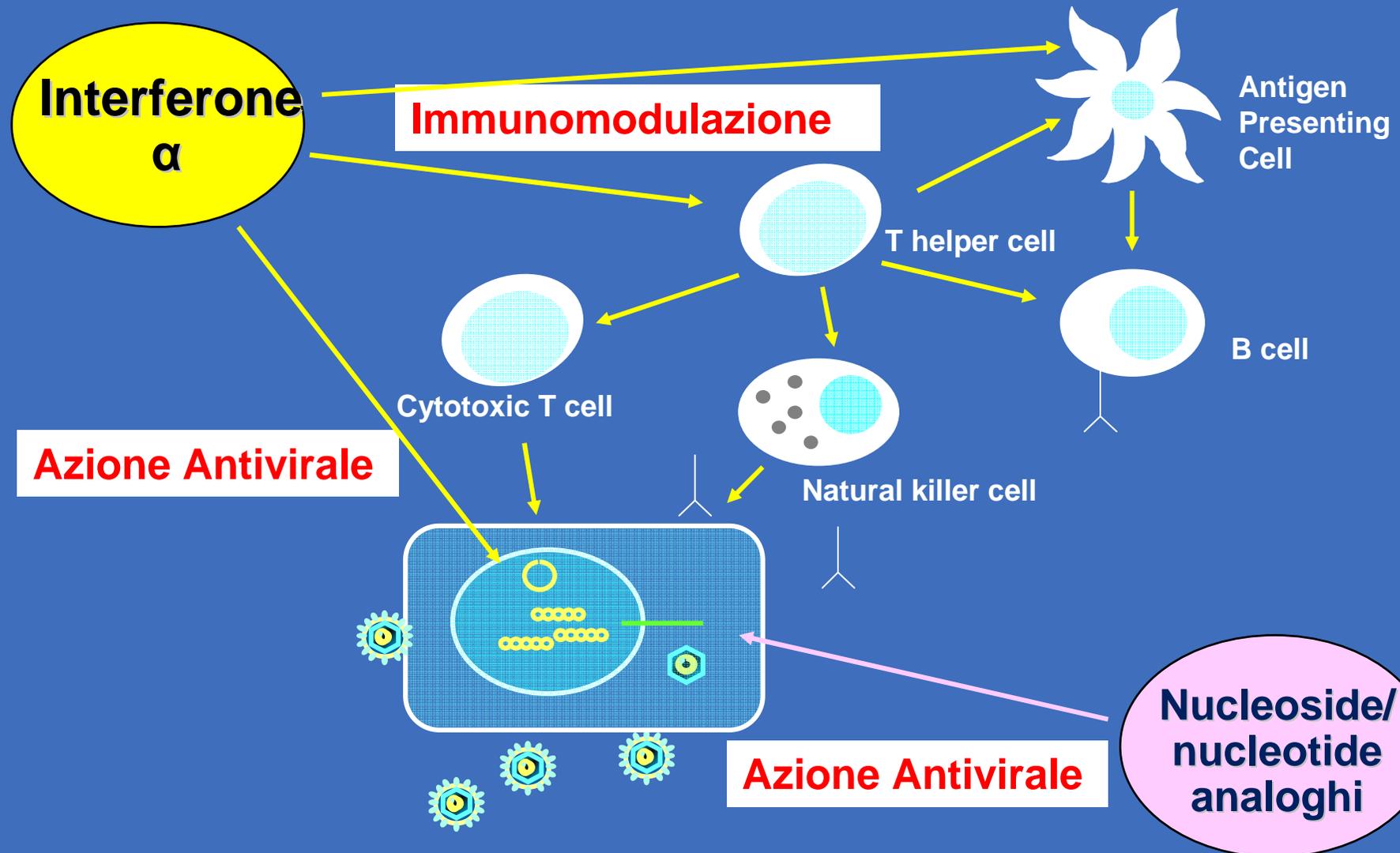
Marker line	
Conj. control	1
Amp. control	2
<hr/>	
Genotype A	3
	4
Genotype B	5
	6
Genotype C	7
	8
Genotype D	9
	10
Genotype E	11
	12
Genotype F	13
	14
Genotype G	15
	16



# Infezione cronica da HBV: evoluzione



# Terapie per Epatite B Cronica



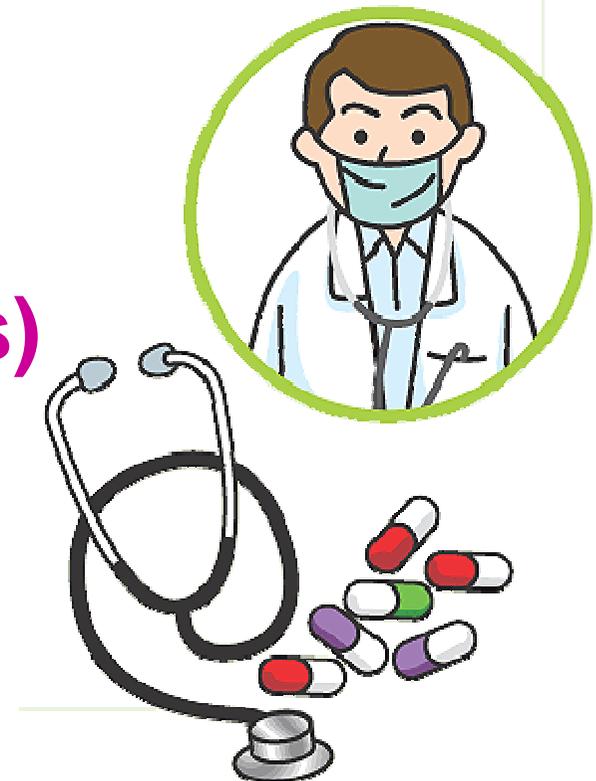
# Terapia epatite B: due approcci diversi

## Interferone (PEG-IFN)

- ❑ Meccanismo immunostimolante-antivirale
- ❑ Terapia “finita” (48 settimane)

## Analoghi nucleosid(t)ici (NUCs)

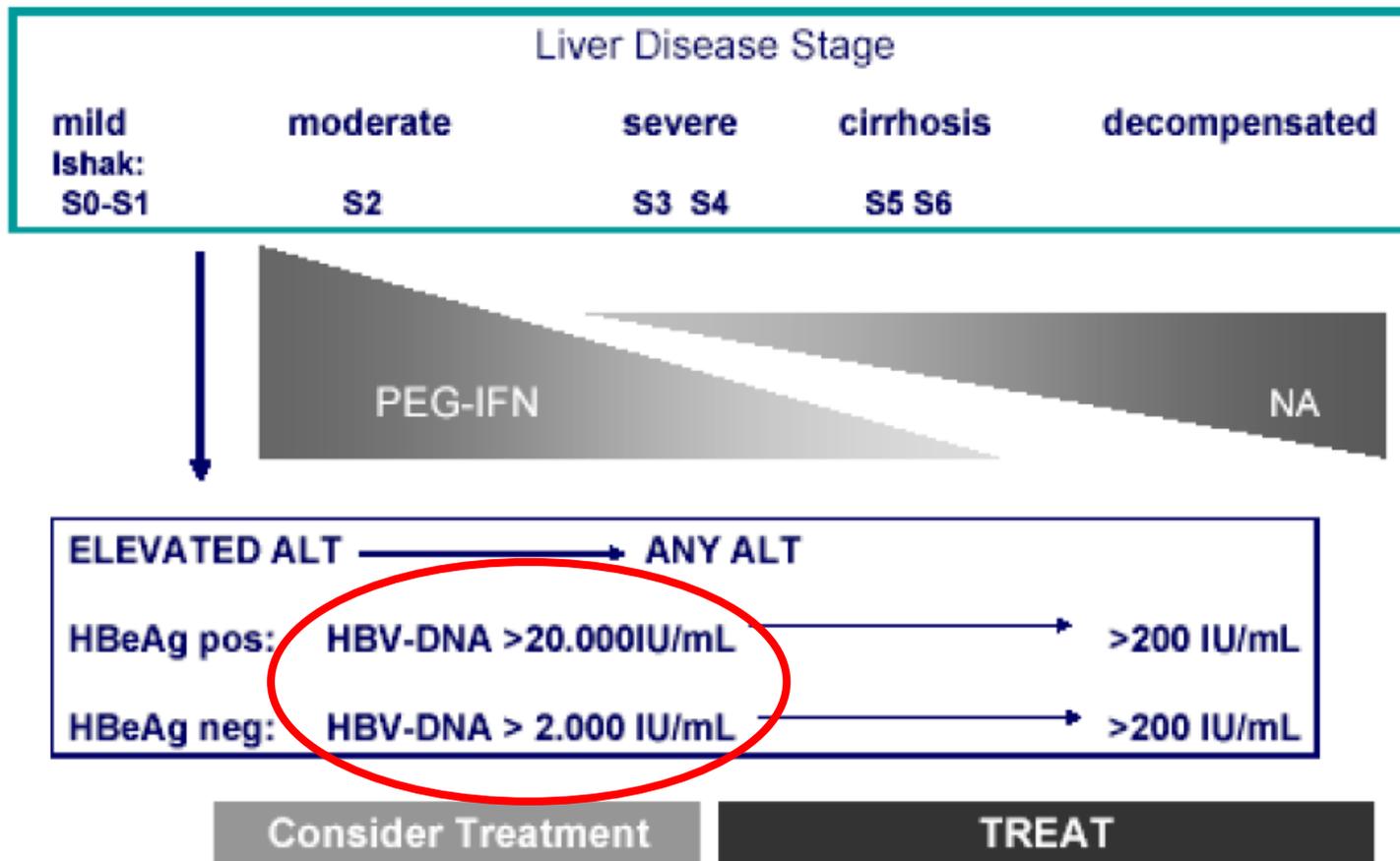
- ❑ Meccanismo antivirale puro
- ❑ Terapia “long term”



HOW, WHOM and WHEN TO TREAT  
and WHAT STRATEGY



The STRESA Paradigma



# Scopo monitoraggio terapia Epatiti B e C

- ❑ Misura efficacia antivirale: HBV, HCV
- ❑ Predizione dell'outcome: HBV, HCV
- ❑ Modifica precoce della terapia
  - sospensione per inefficacia: HCV
  - adattamento: HBV
- ❑ Diagnosi di resistenza: HBV



# Risposta virologica HBV

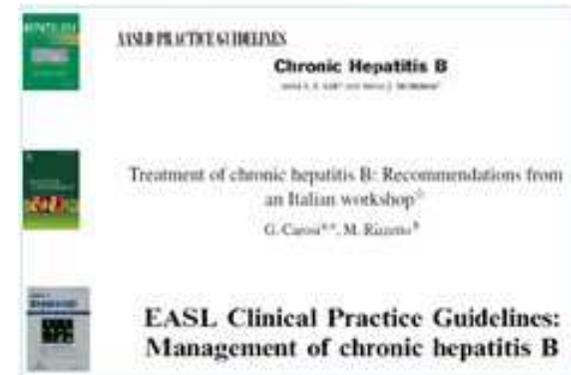


**Risposta ad IFN**

**HBV-DNA <2000 UI/mL  
alla 24 sett. terapia**

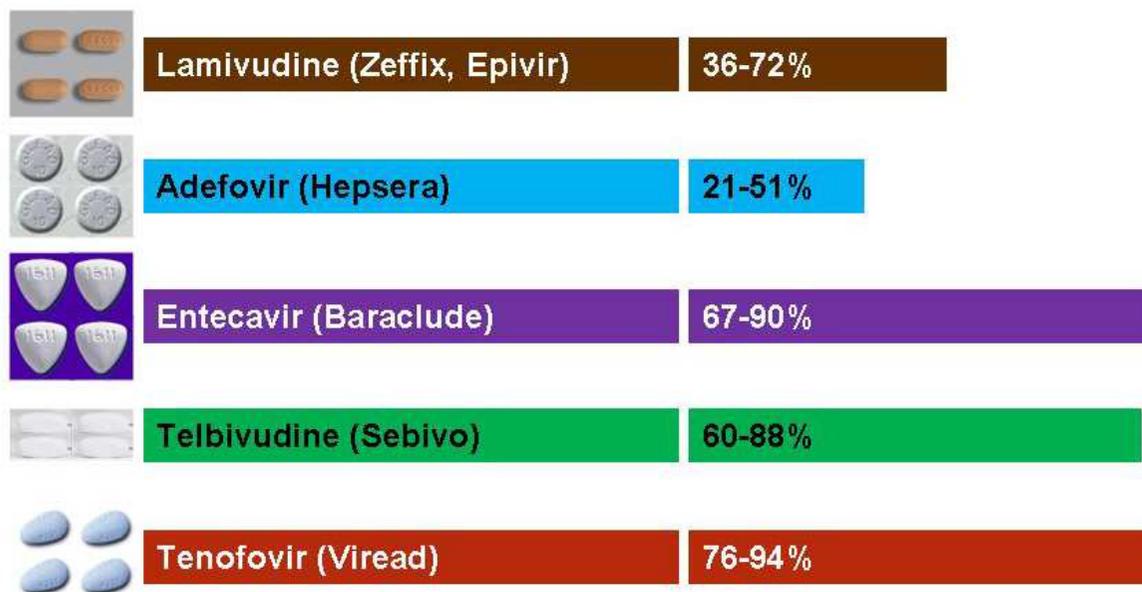
**Risposta a NUCs**

**HBV-DNA <15 UI/mL  
entro 48 sett. terapia**



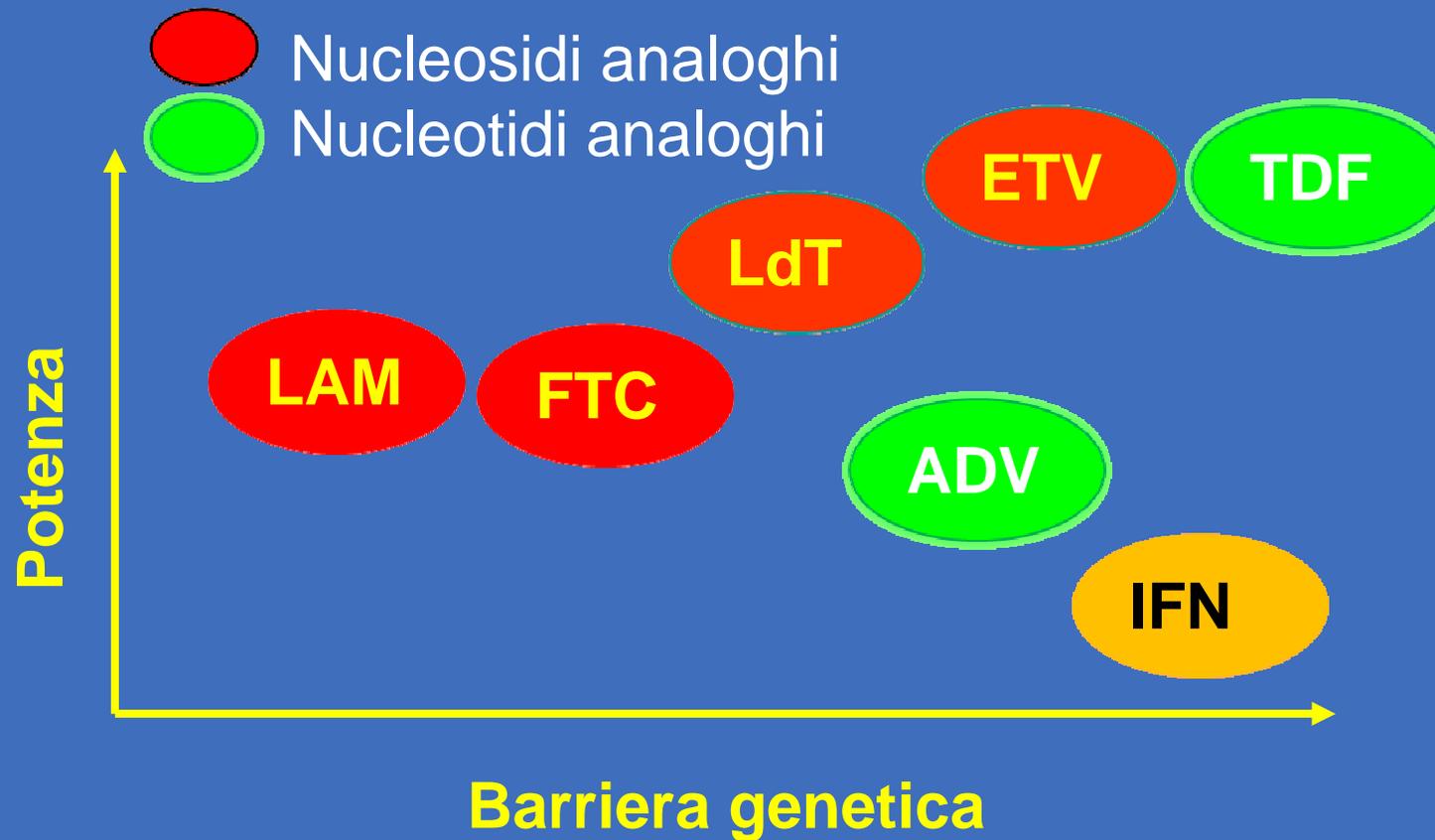
# Terapia Epatite B cronica

HBV-DNA below level of detection  
after 1 year of therapy



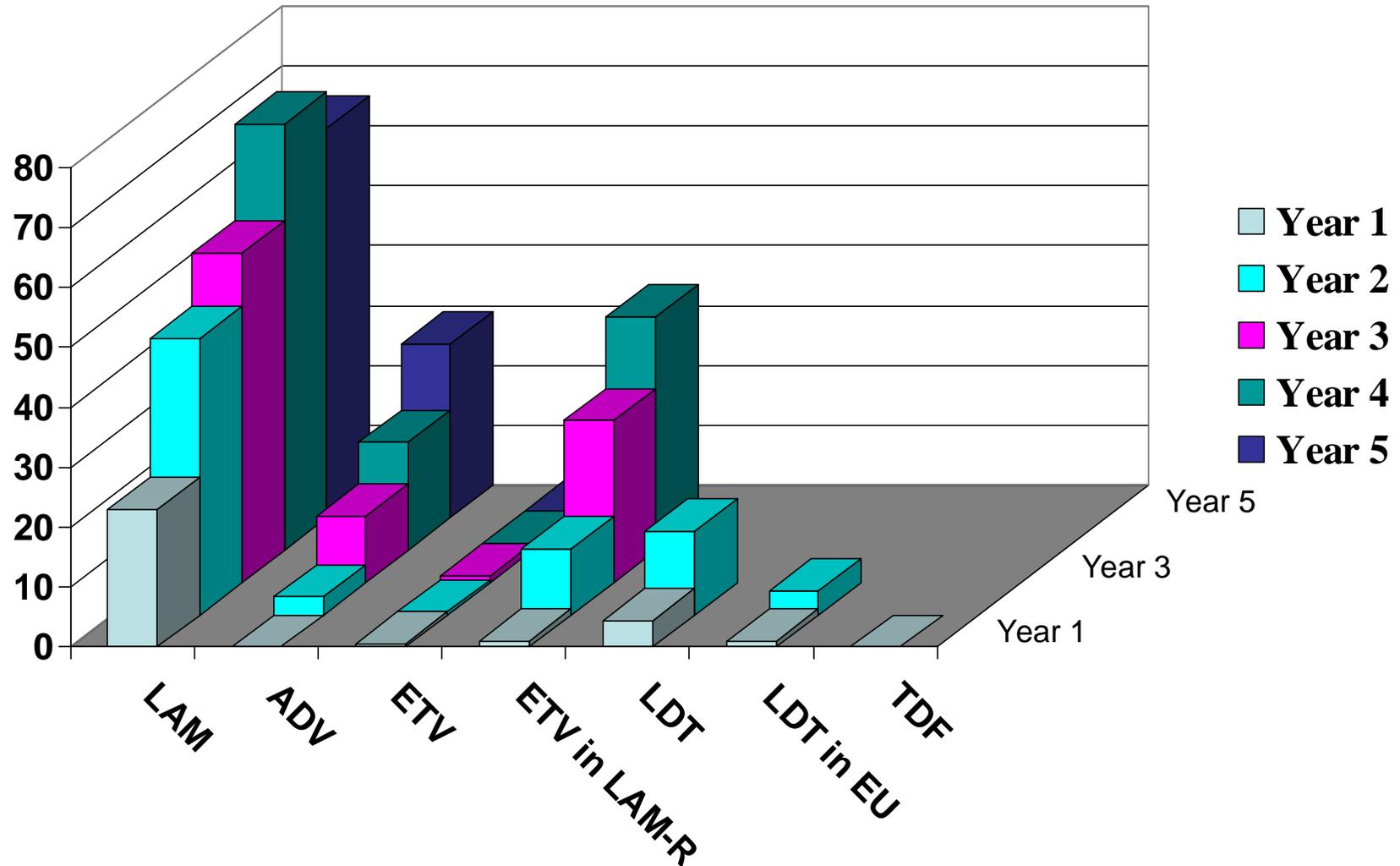
Lai CL, et al. *Hepatology* 2005; 42:748A (AASLD Abstract LB01); Lau G, et al. *NEJM* 2005; 352:2882–2695; Chang T-T, et al. *NEJM* 2006; 354:1000–1010; Marcellin P, et al. *NEJM* 2003;348:808–816; Marcellin et al., AASLD 2007, Heathcote et al., AASLD 2007

# Farmaci anti-HBV



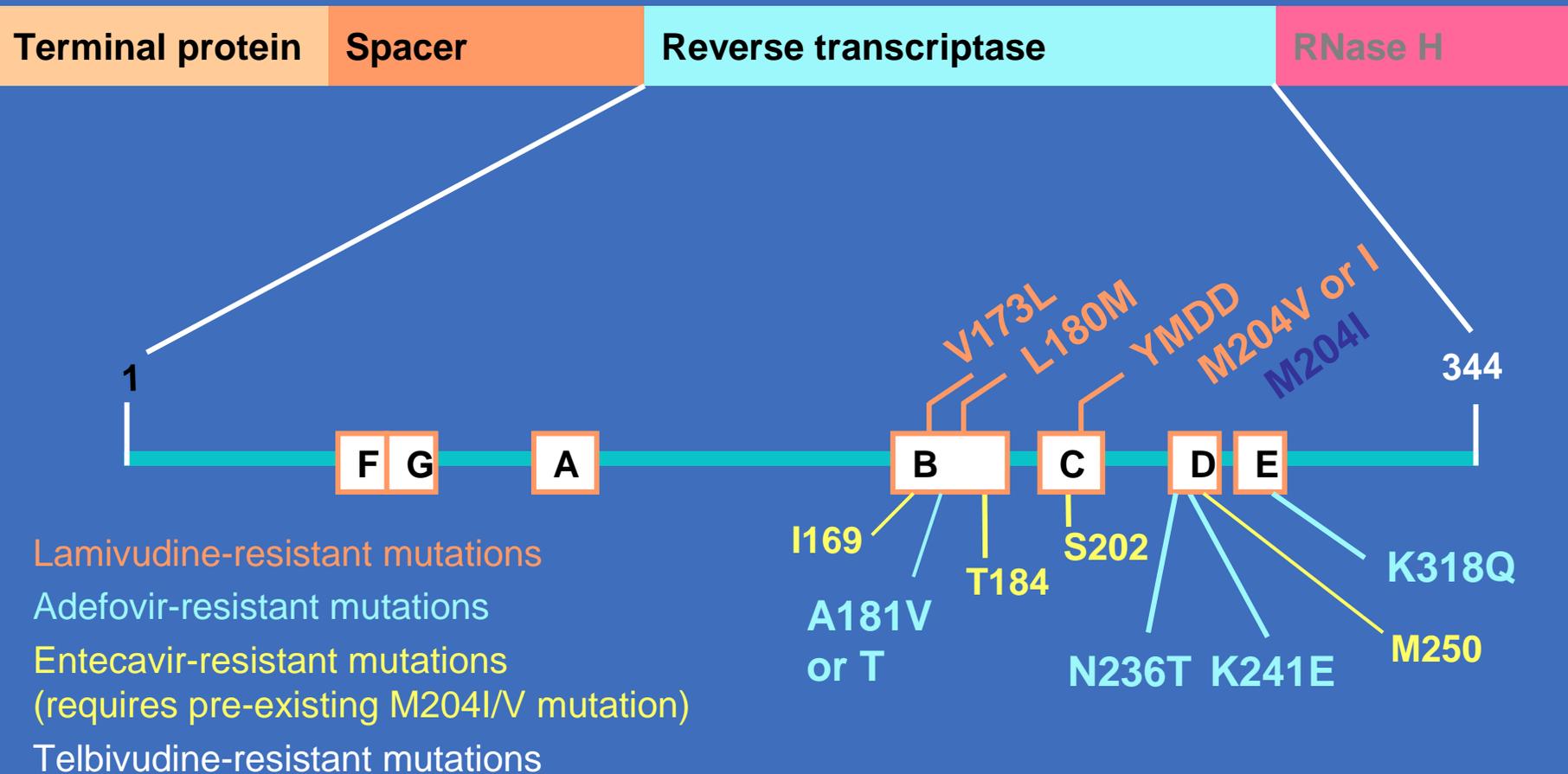
**ATTIVITA' ANTIVIRALE : potenza e barriera genetica**

## Resistenza ad analoghi nucleos(t)idici

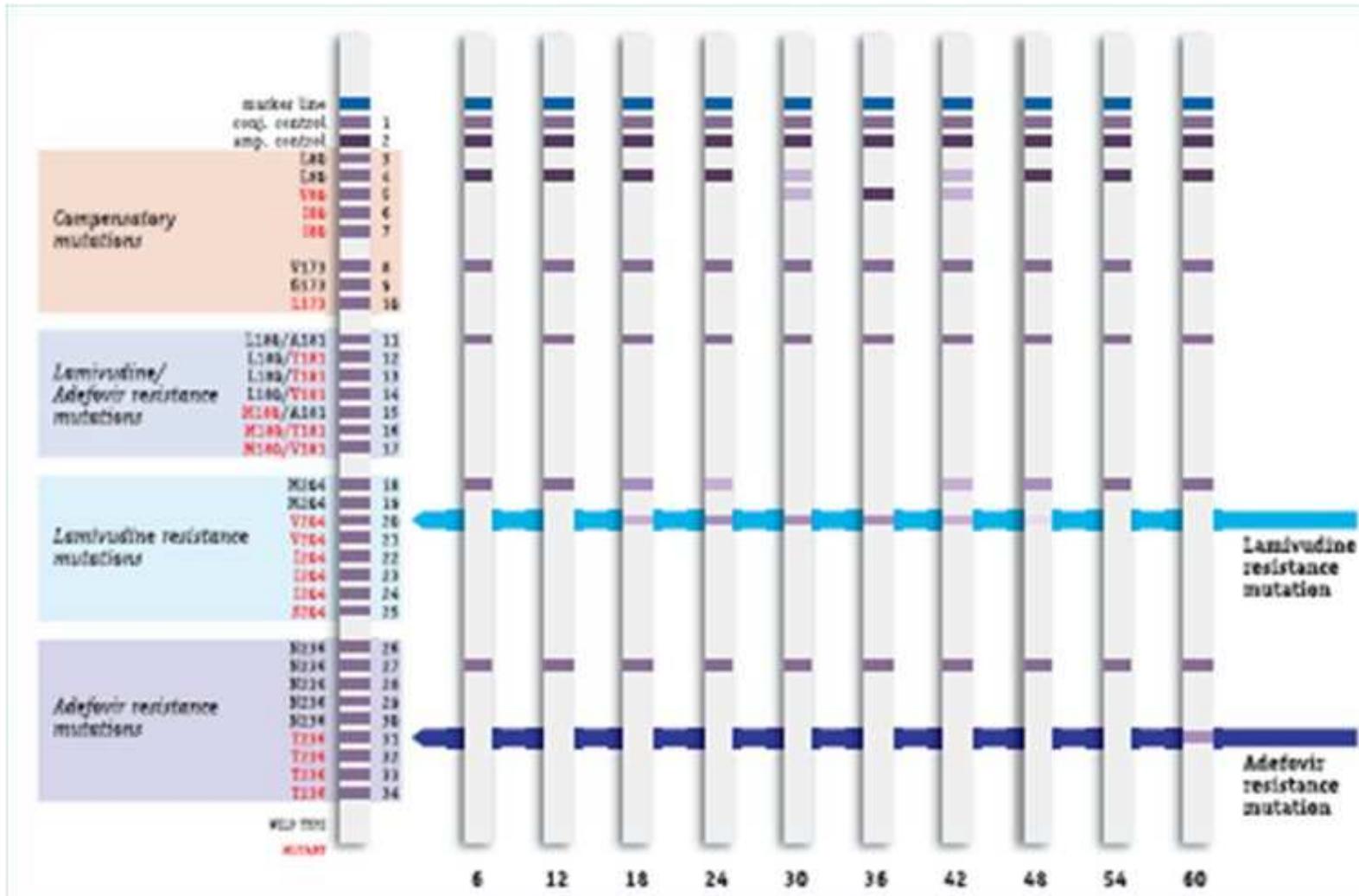


Lai et al. Clin Infect Dis. 2003;36:687-96; Lok et al Gastroenterology 2003; 125 : 1714-1722; Zoulim et al J Viral Hepatitis 2006;13:278-288; Hadziyannis et al NEJM 2005; 352 : 2673-2681; Chang et al. NEJM 2006; 351: 1001-1010; Lai et al NEJM 2006; 354: 1011-1020; Lai et al Abstract # 91, AASLD 2006. Colonna R et al. Abstract #110, AASLD 2006. Globe study. Data on file. Keefee et al. Clin Gastroenterol Hepatol 2008; 6:268-274.

# Mutazioni nel genoma HBV causa di resistenza ad antivirali



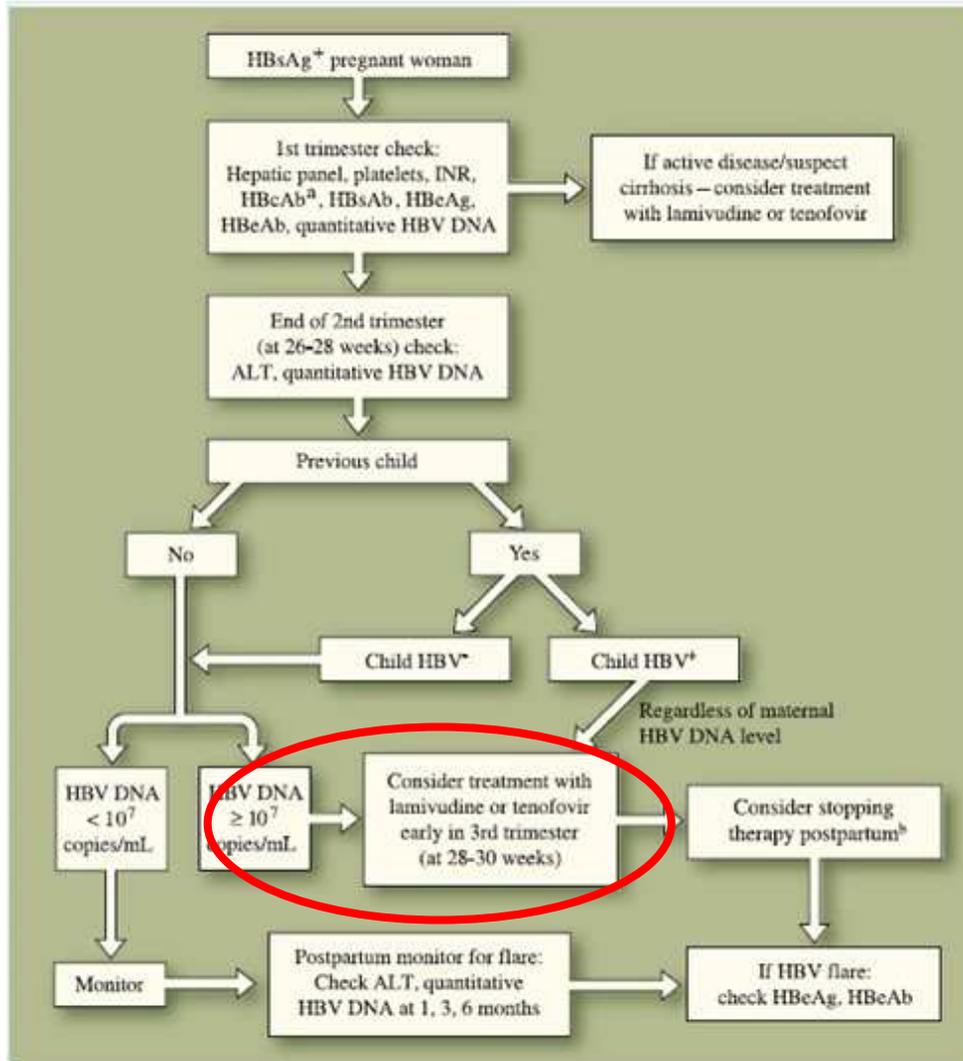
# Resistenza HBV ad antivirali: ibridazione inversa



# Profili di Resistenza indotti da mutazioni virali



# HBV e gravidanza



## Hepatitis B Therapy in Pregnancy

Curr Hepatitis Rep (2010) 9:197-204

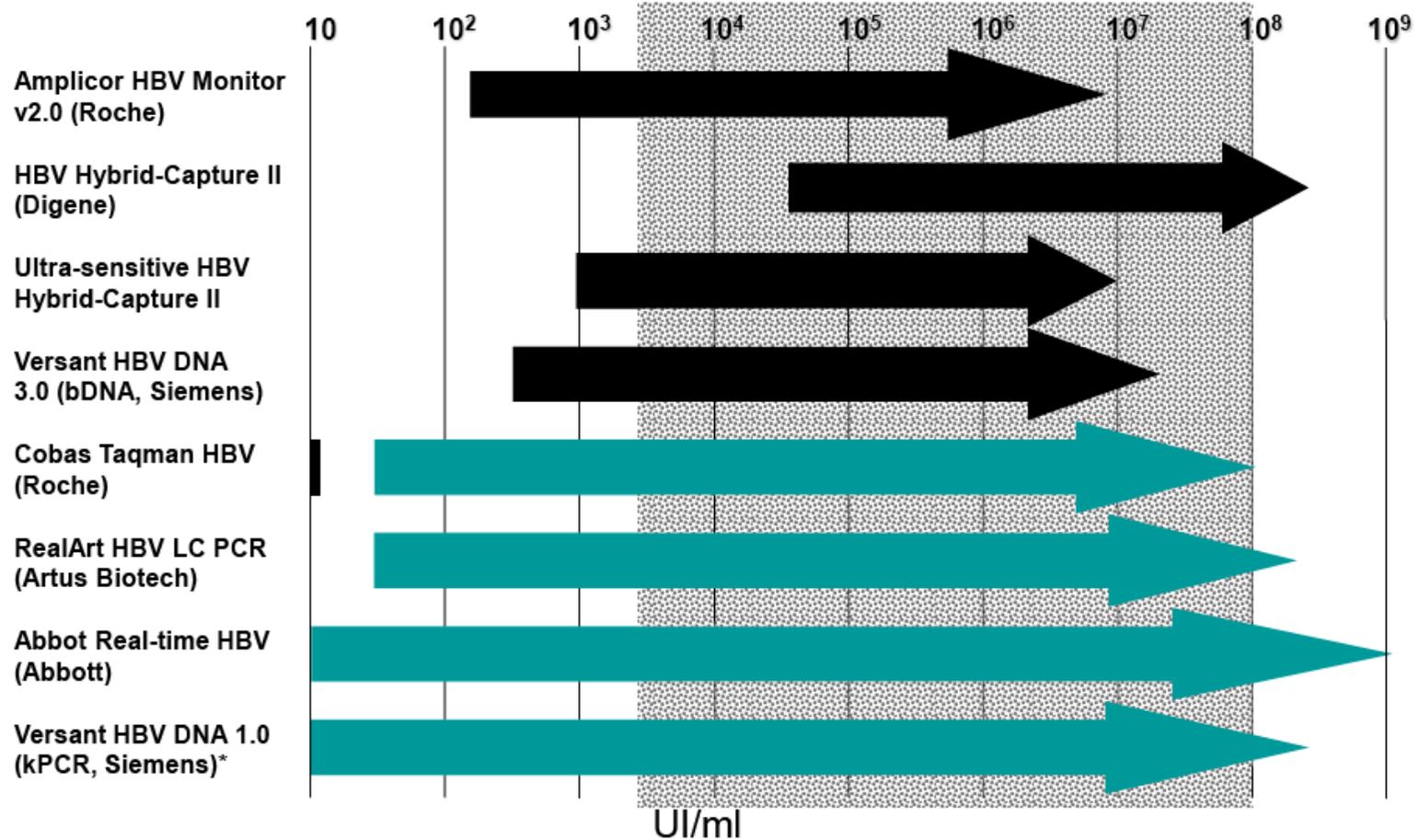
Natalie H. Bzowej



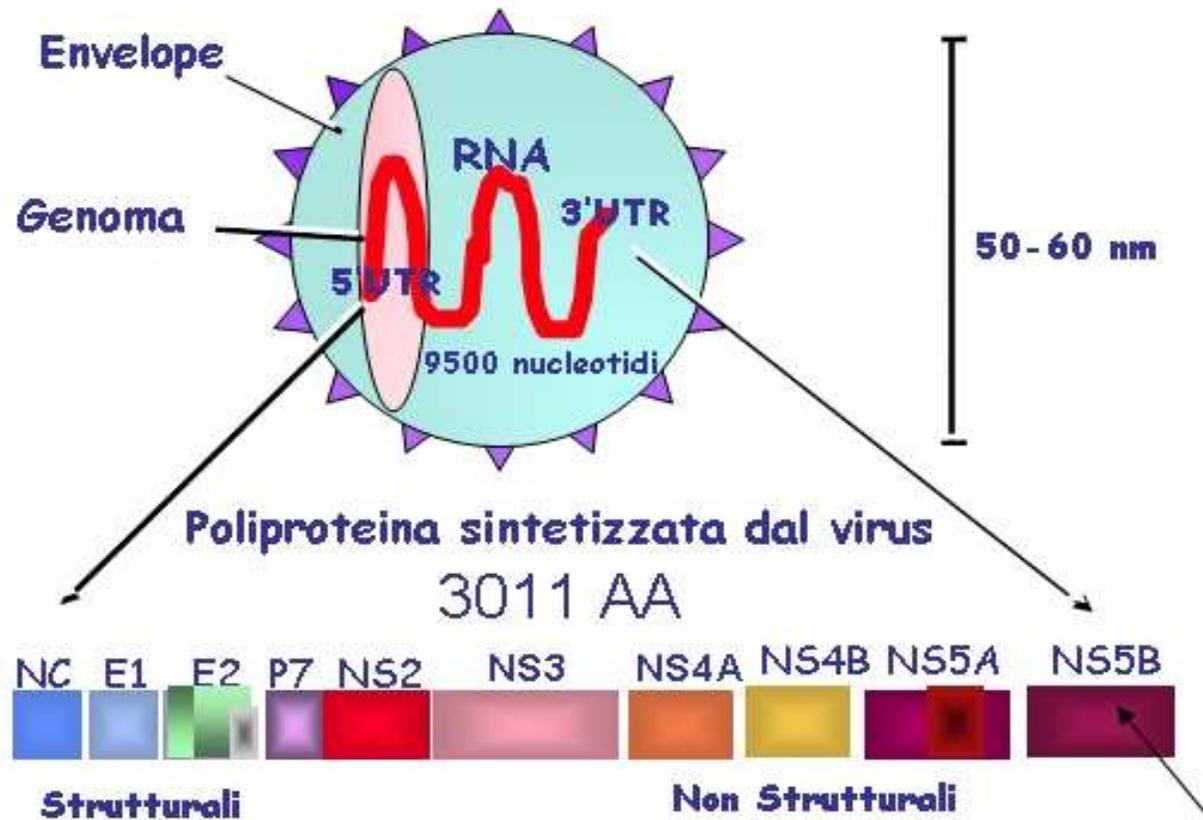
# Kits HBV-DNA



## Kits HBV-DNA: sensibilità e ranges dinamici

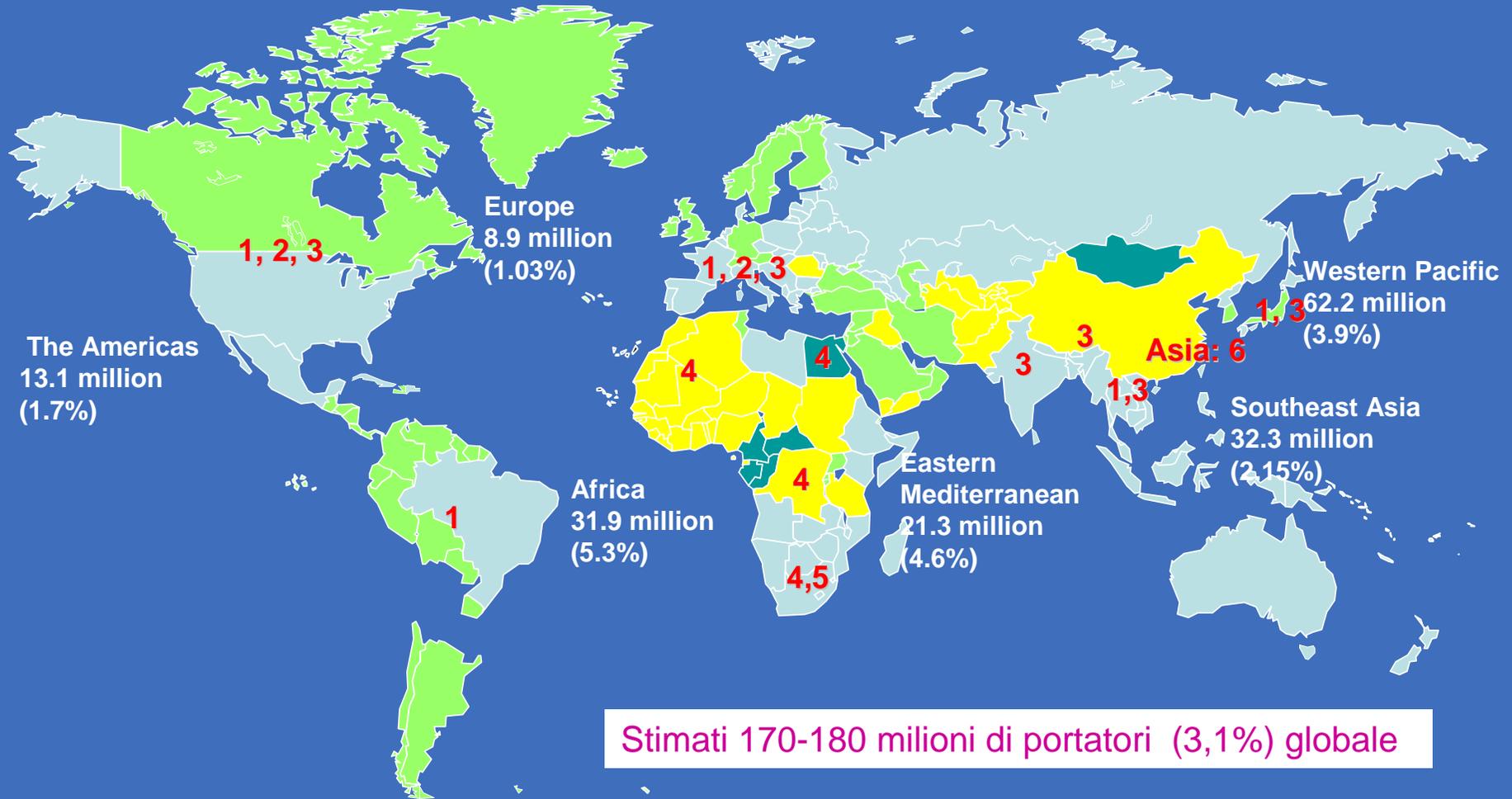


# Virus Epatite C



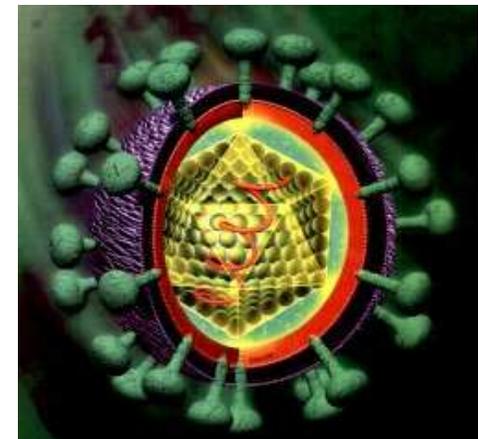
Mutazioni del genoma durante la  
replicazione virale con formazione di  
varianti virali definite *QUASISPECIE*

# Prevalenza HCV nel mondo



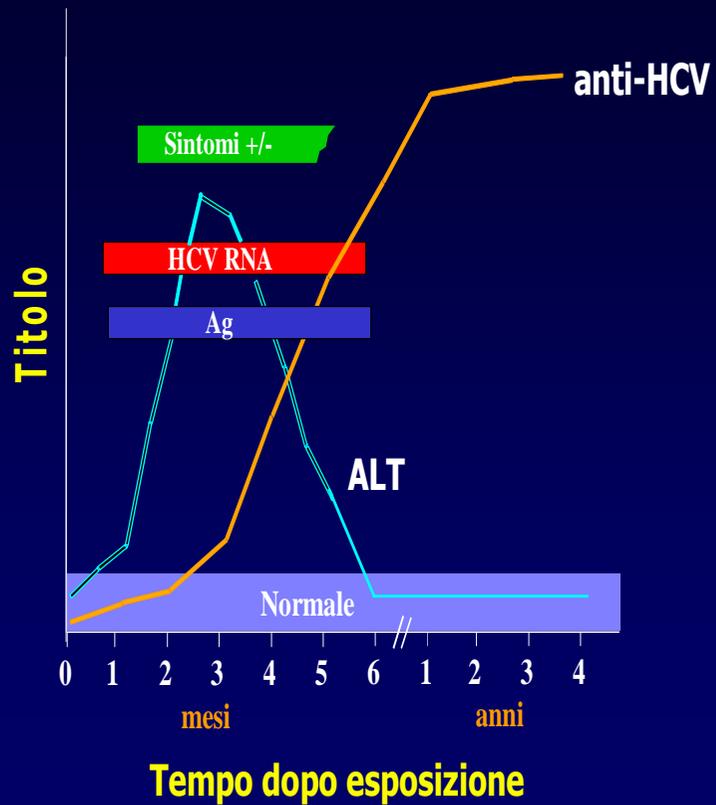
# HCV e Biologia Molecolare

- (HCV-RNA qualitativo)
- HCV-RNA quantitativo (“viral load”)
- Genotipizzazione

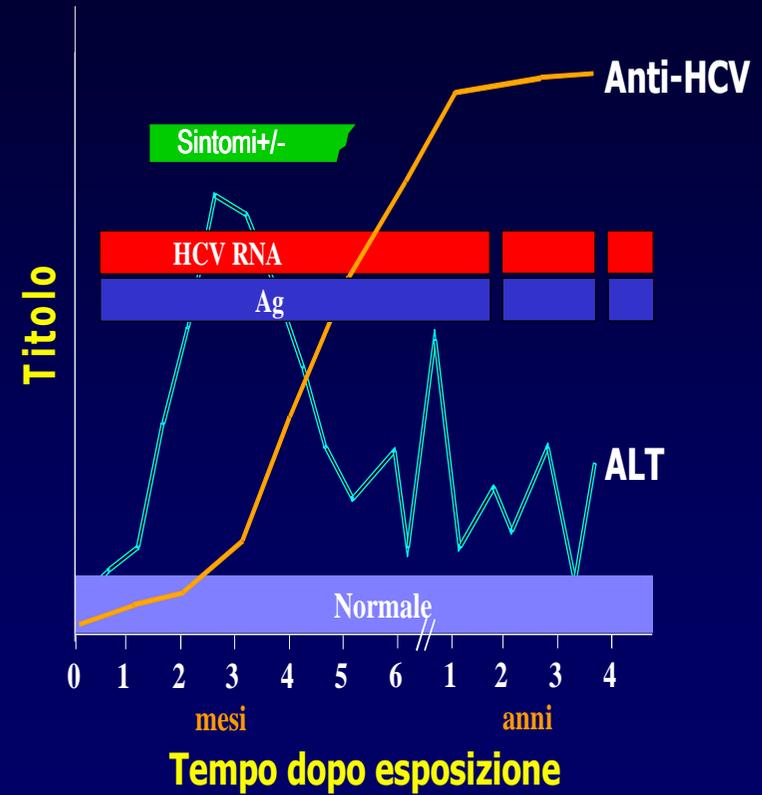


# Marcatori di Infezione da HCV

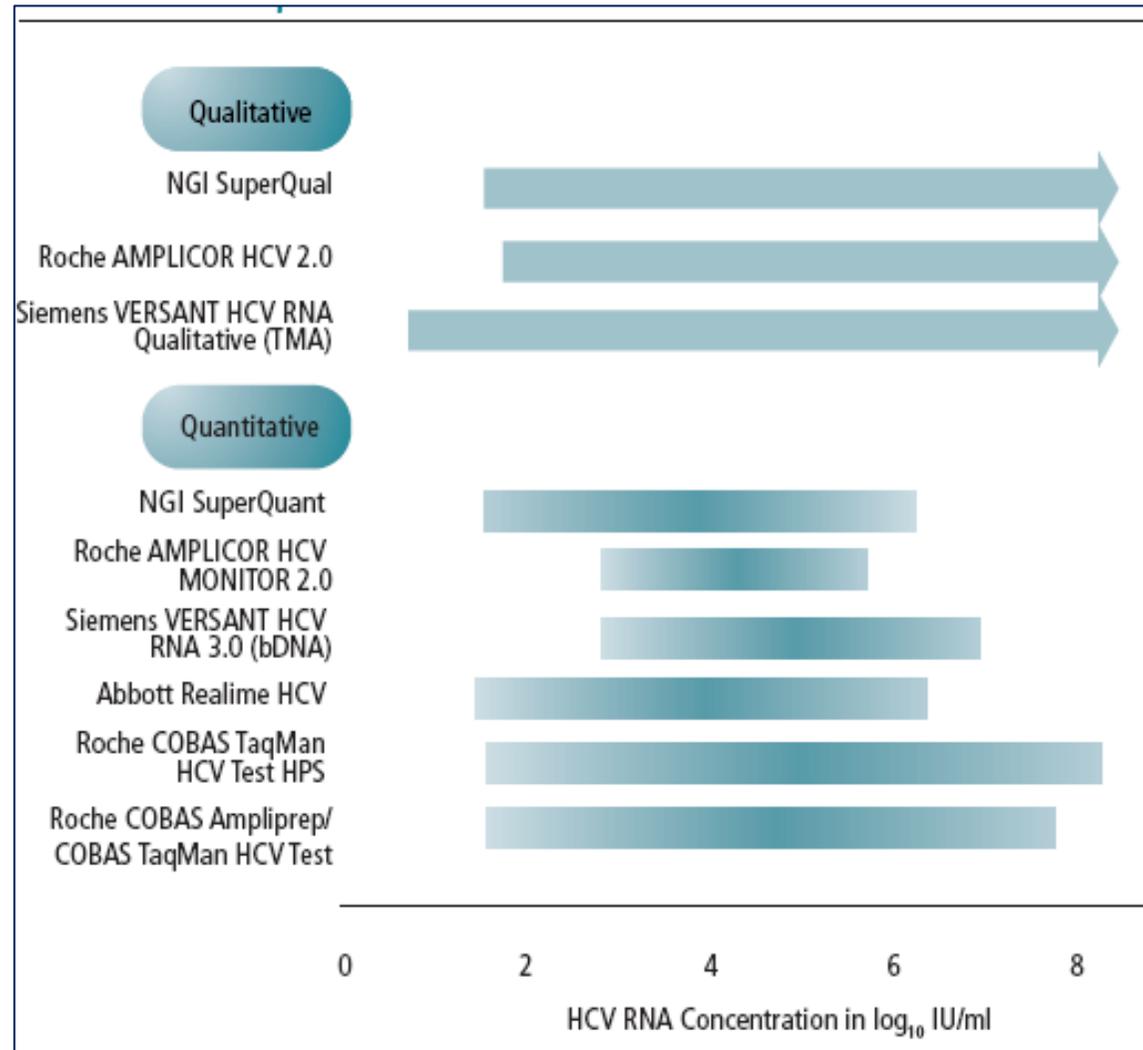
## Epatite acuta che guarisce



## Epatite acuta che cronicizza



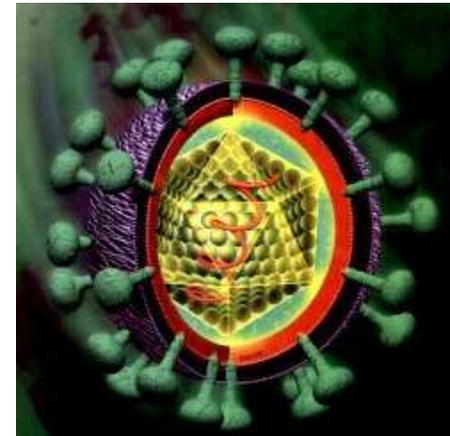
# Kit HCV-RNA: sensibilità e ranges dinamici



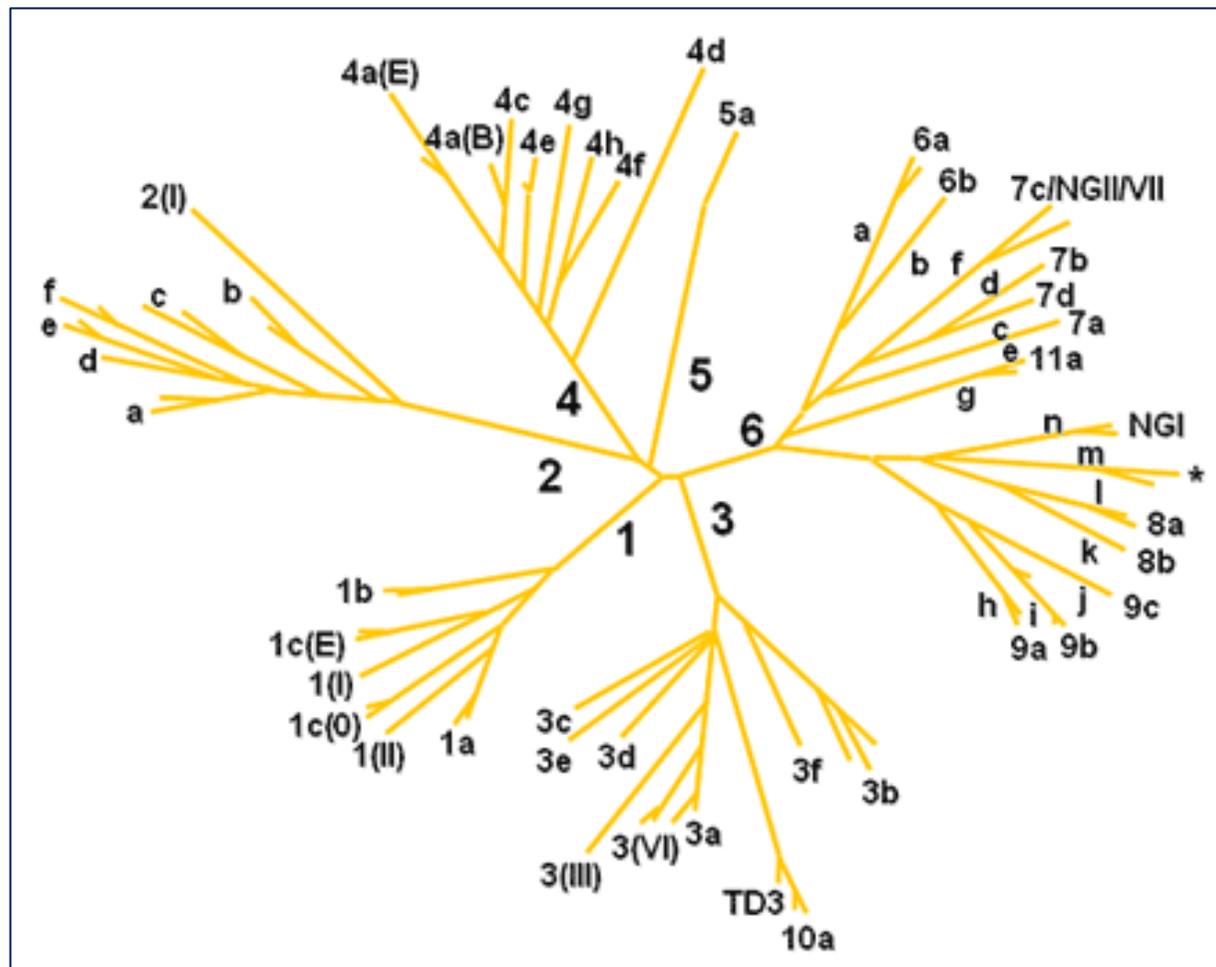


# Biologia Molecolare ed Epatite C acuta

- ❑ Generalmente non necessaria
- ❑ Utile nella identificazione di:
  - fasi pre-sierologiche
  - trasmissione verticale (monitoraggio neonato 0,3,12 mesi)



# HCV genotipi



# Prevalenza genotipi HCV nel mondo

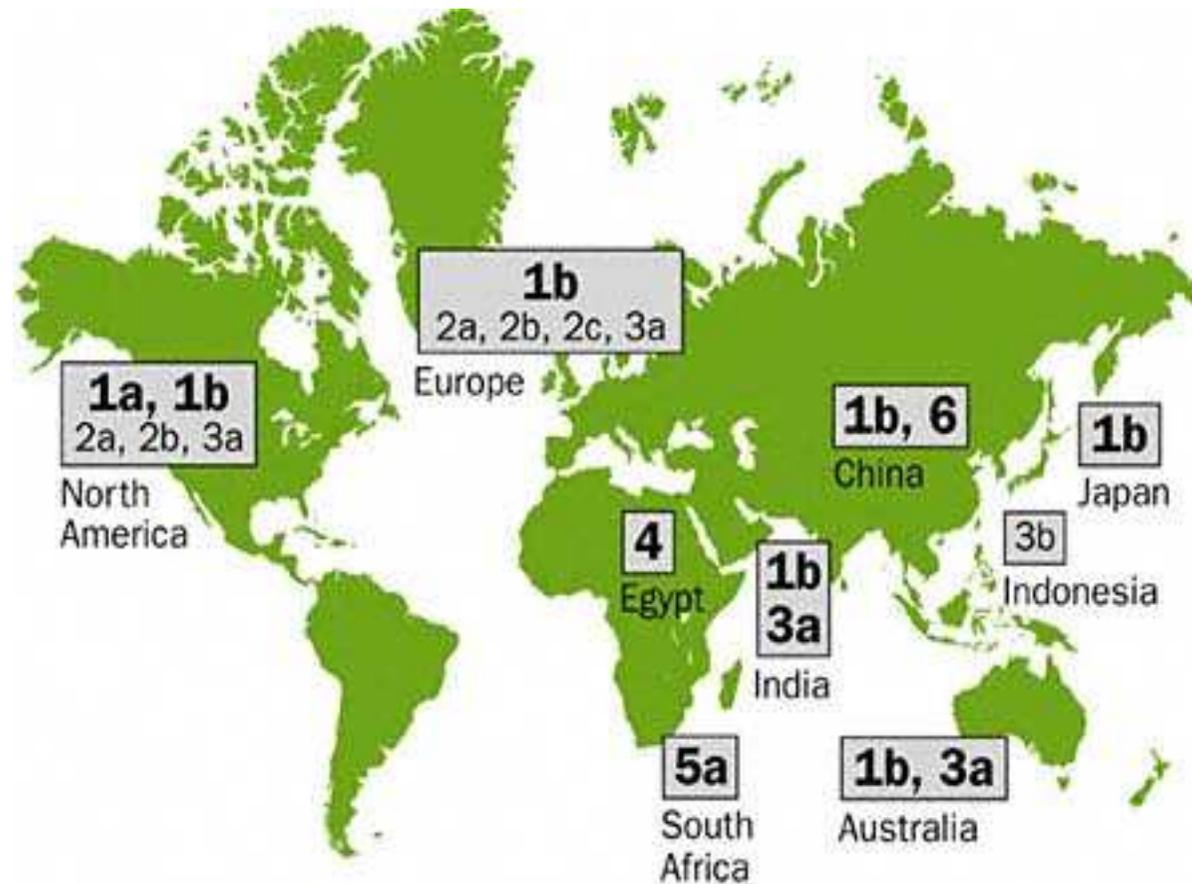
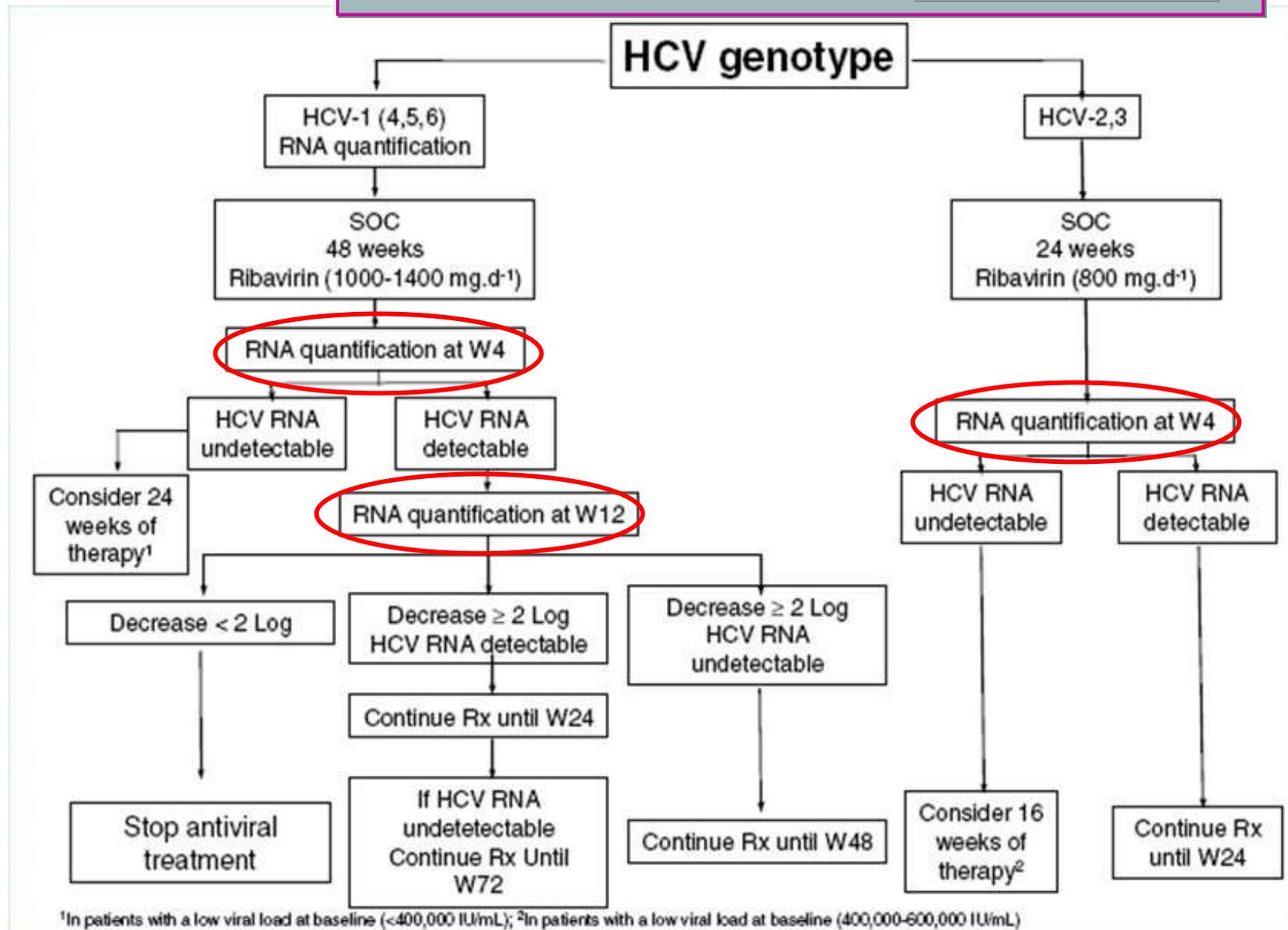


Figure 5. Geographic distribution of hepatitis C viral species.

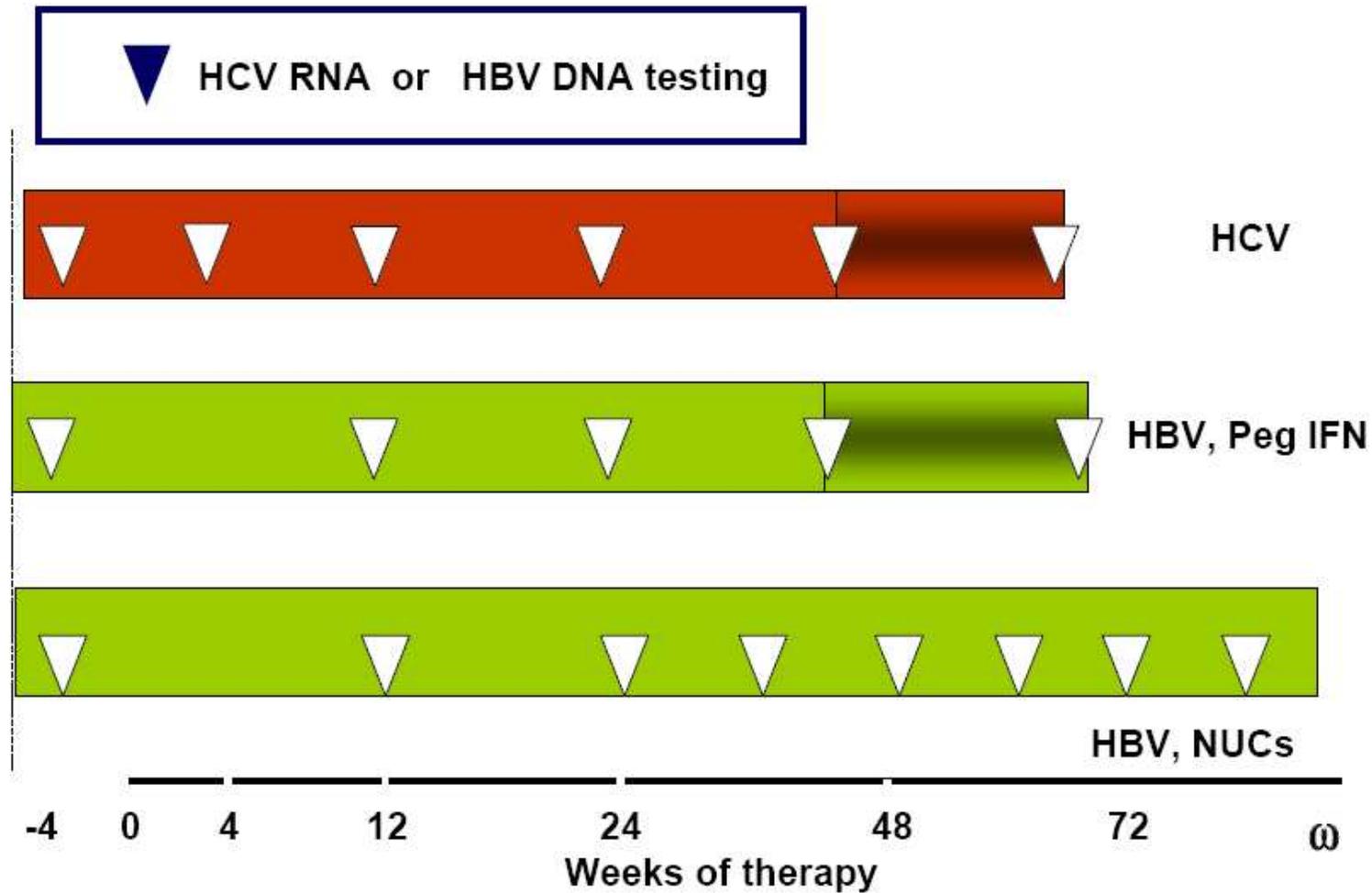


## Genotipo e risposta alla terapia

- ❑ I genotipi 1 (a,b) e 4 presentano una minore risposta alla terapia
- ❑ “*Viral load baseline*” e genotipo sono i due principali **predittori** indipendenti di risposta sostenuta alla terapia (SVR)
- ❑ Sono previsti schemi posologici differenziati tra genotipi (dose e durata terapia)
- ❑ Tuttavia pazienti con lo stesso genotipo e con gli stessi livelli di viremia basale hanno differenti risposte alla terapia → anche altri fattori condizionano la risposta alla terapia (insulinoresistenza, mutazione IL28R per IFN  $\lambda$ )



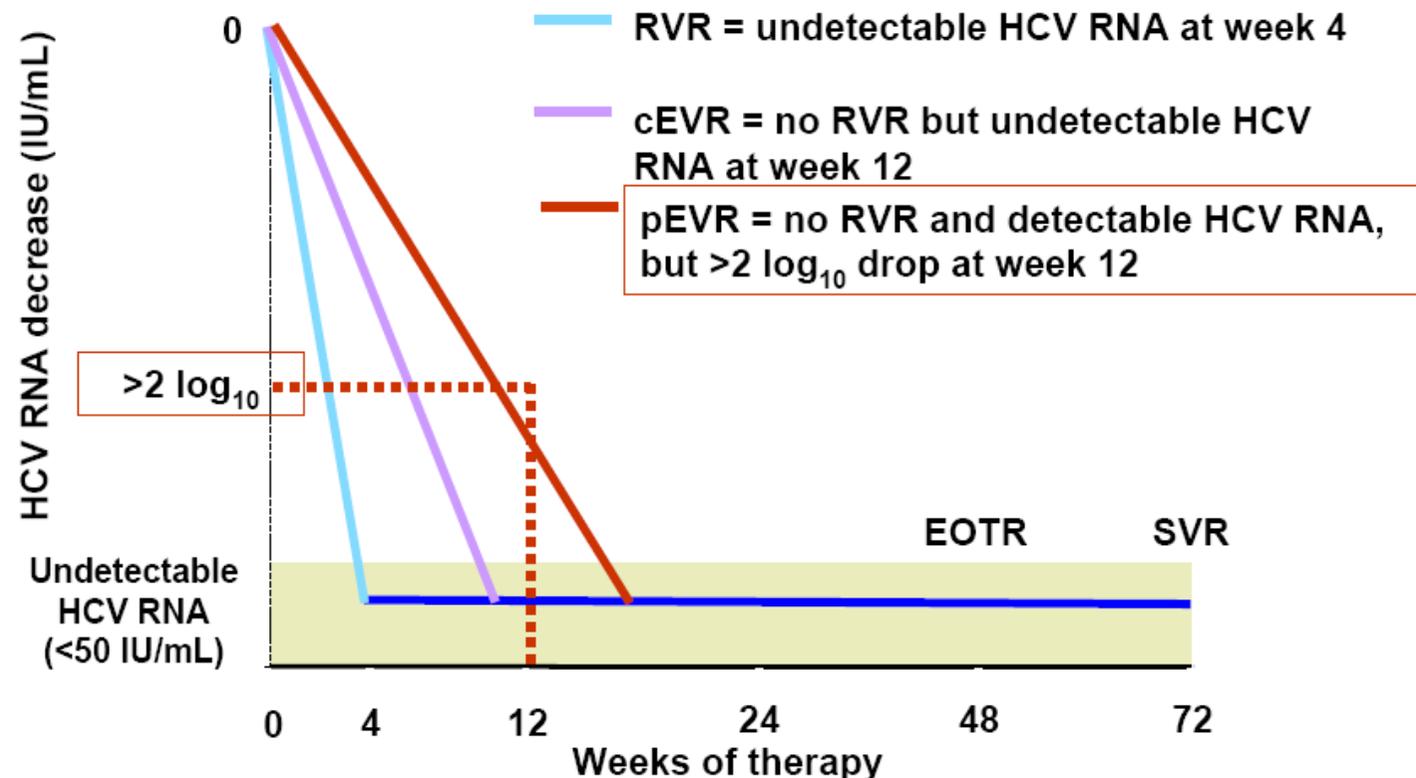
# Timing del monitoraggio virologico



# Risposta virologica alla terapia: HCV-RNA

- **RVR**: negativo a 4 settimane di terapia
- **EVR**: completa → negativo a 12 sett.  
parziale → calo  $> 2 \log_{10}$  a 12 sett.
- **NR**:  $< 2 \log_{10}$  da valori base a 12 sett.
- **non-vRVR**: calo  $< 0.8 \log_{10}$  a 48 ore  
predittività negativa per SVR
- **SVR**: negatività a 6 mesi da fine terapia

## Definizione della risposta virologica alla 4 e 12 settimana di terapia



RVR = rapid virological response; cEVR = complete early virological response;  
pEVR = partial early virological response.



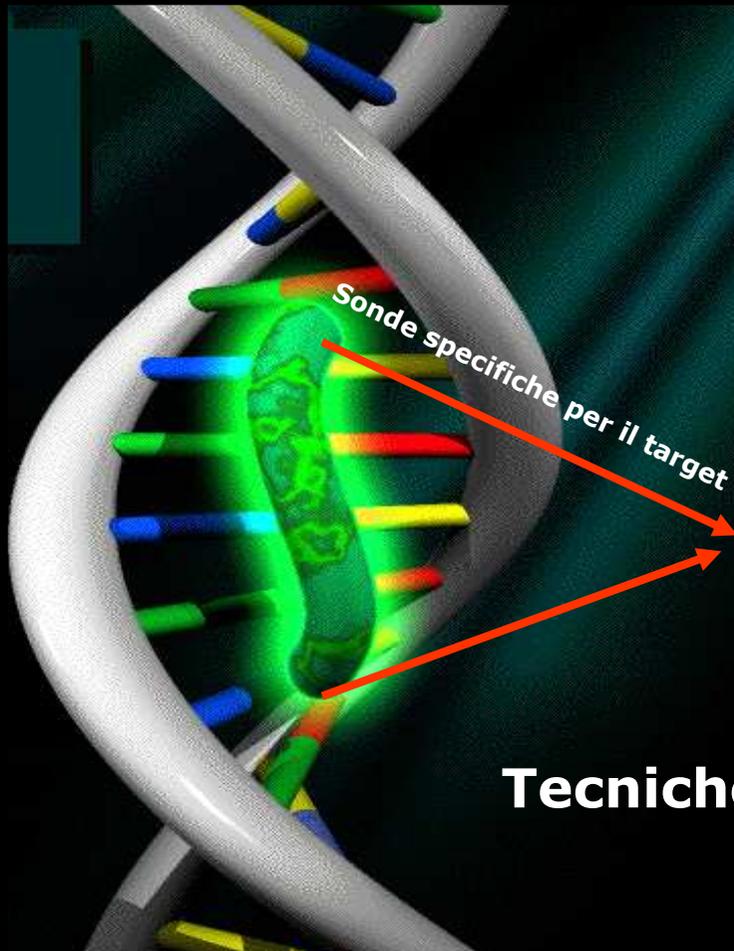
# Monitoraggio terapia epatite C genotipo 1



# Monitoraggio terapia epatite C genotipo 2/3



## HBV DNA – HCV RNA



**Il rilevamento  
del genoma virale è il parametro  
più attendibile  
per la diagnosi e per il  
monitoraggio dell'infezione**

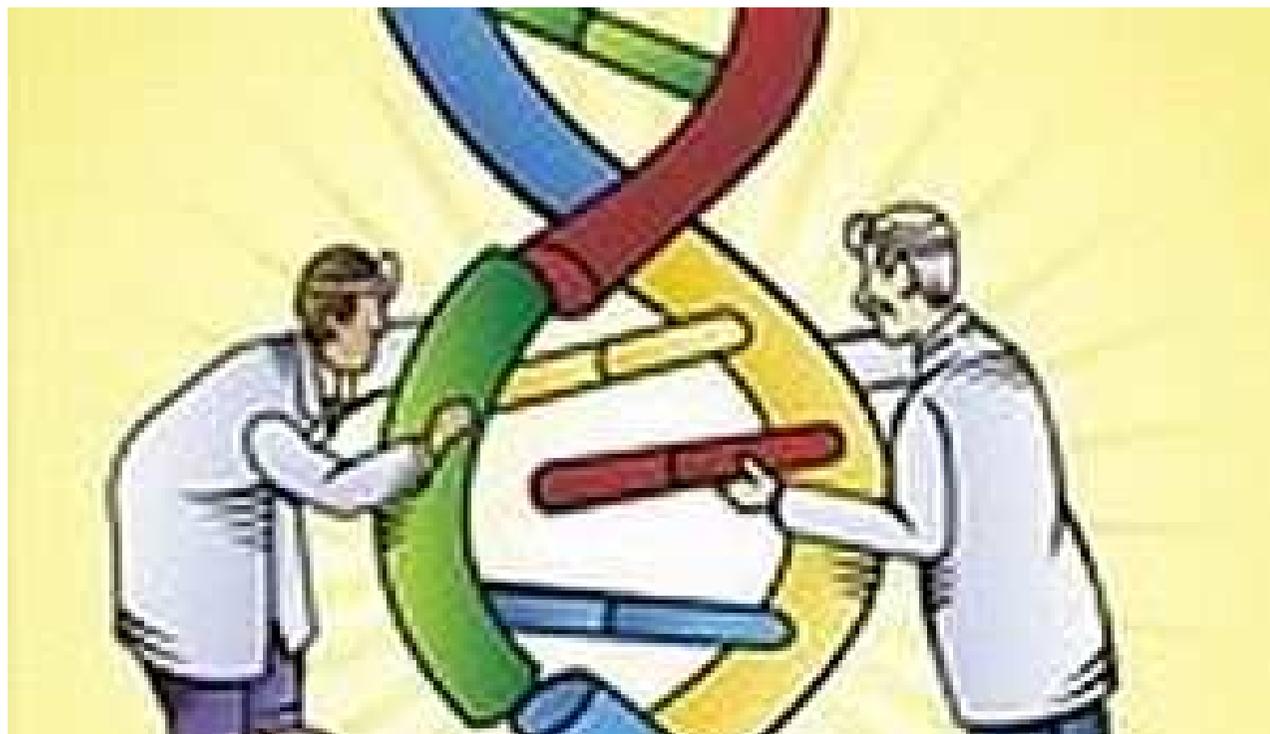
**Tecniche di biologia molecolare**



# Take-home Messages

Nella gestione delle epatiti B e C la Biologia Molecolare è in grado di:

- Confermare la diagnosi (f. acute e croniche)**
- Definire indici prognostici**
- Orientare la scelta di opzioni terapeutiche (farmaco, posologia, durata, sospensione)**
- Monitorare outcome clinico e terapeutico**
- Confermare trasmissione materno-fetale**



**GRAZIE dell'Attenzione!**





ERROR: undefined  
OFFENDING COMMAND: BASSETTI\_Le

STACK:

```
(11)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20110131084841+01'00')  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20110131084841+01'00')  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```