

Infezione cronica da HBV: prevalenza e impatto di mutazioni *escape* sulla risposta alla terapia antivirale

Living with HBV chronic infection: prevalence and clinical impact of *escape* mutants

Laura Ambra Nicolini¹, Patrizia Caligiuri², Livia Di Nino³, Bianca Bruzzone², Antonio Di Biagio^{1,4}

¹ Infectious Diseases Unit, Ospedale Policlinico San Martino-IRCCS, Genoa, Italy

² Hygiene Unit, Ospedale Policlinico San Martino-IRCCS, Genoa, Italy

³ Department of Surgical Sciences and Integrated Diagnostics, University of Genoa, Genoa, Italy

⁴ Department of Health Sciences (DISSAL), University of Genoa, Genoa, Italy

Riassunto

Il virus dell'epatite B (HBV) rappresenta un importante problema sanitario, con 1.5 milioni di nuove infezioni ogni anno. L'infezione da HBV può essere prevenuta dalla vaccinazione con l'antigene HBV ricombinante (HBsAg). Mutazioni *escape* nel "a-determinant" di HBsAg possono causare un cambio conformazionale di HBsAg, che potrebbe evadere la diagnosi di HBV e la seroprotezione indotta dal vaccino.

In questo studio, abbiamo voluto valutare la prevalenza e l'impatto clinico delle mutazioni *escape* in una coorte retrospettiva di pazienti con infezione cronica da HBV.

Sono stati valutati tutti i pazienti con infezione cronica da HBV, seguiti presso l'Unità di Malattie Infettive del Policlinico San Martino dal 2014 al 2018, con sequenziamento di HBV. Sono state raccolte anche le informazioni sulla coinfezione da HIV e HCV, nonché lo status per HBeAg, il genotipo di HBV e la presenza di mutazioni dei geni S e RT. La risposta virologica era definita da HBV-DNA non rilevabile entro 12 mesi dall'inizio del trattamento, secondo le linee guida EASL.

Complessivamente, sono stati valutati 143 pazienti con HBV, 54 (37.8%) dei quali inclusi nel presente studio. La maggioranza presentava HBV con genotipo D (36/54, 66.6%) e genotipo A (11/54, 20.4%). Nove (16.6%) presentavano almeno una mutazione *escape*.

Otto pazienti presentavano la mutazione *escape* prima di iniziare il trattamento per HBV, mentre nell'ultimo il sequenziamento è stato effettuato solo dopo l'inizio del trattamento con entecavir.

Tutti i soggetti con mutazione *escape* erano negativi per HBeAg prima di iniziare il trattamento per HBV ($p=0.04$). D'altro canto, le mutazioni *escape* non erano associate al genotipo D dell'infezione (4/36, 11%, in genotipo D vs. 5/18, 27.7%, $p=0.14$, in genotipi non-D). La risposta virologica è stata raggiunta in 39 pazienti (72%) e non era associata alle mutazioni *escape* al basale ($p=0.7$), alle mutazioni RT ($p=0.46$) e al genotipo HBV ($p=0.33$).

Nella nostra coorte, la prevalenza di mutazioni *escape* era 16.6%. La risposta virologica non era influenzata dalla presenza delle mutazioni.

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) is a major health problem, accounting for 1.5 million new infections each year. HBV infection can be prevented by HBV vaccination with recombinant HBV s Antigen (HBsAg). However, escape mutations in the "a-determinant" of the HBsAg may cause a conformational change of HBsAg that could escape HBV diagnosis and vaccine-induced seroprotection. In this study, we aimed at evaluating the prevalence and clinical impact of escape mutations in a cohort of patients living with chronic HBV infection.

This was a retrospective cohort study. All chronically HBV infected patients receiving care at the unit of Infectious Diseases at Policlinico San Martino Hospital from 2014 to 2018 were evaluated.

Patients were included if they received HBV sequencing. Co-infection with HIV and HCV were reported as well as HBeAg status, HBV genotype and presence of genus S and RT mutations. Virological response was defined as undetectable HBV-DNA within 12 months of treatment, according to 2017 European Association for the Study of the Liver EASL guidelines.

Overall, 143 HBV patients were evaluated and 54 (37.8%) were included in the present study. The majority of them harboured HBV genotype D (36/54, 66.6%) and genotype A (11/54, 20.4%). Nine (16.6%) patients harboured at least one escape mutation. Eight patients had escape mutation before starting HBV treatment, while the last receive HBV sequencing only after starting treatment with entecavir. All patients with escape mutations were tested negative for HBeAg before receiving HBV treatment ($p=0.044$). On the other hand, escape mutations were not related to genotype D infection (4/36, 11%, in genotype D vs. 5/18, 27.7%, $p=0.14$, in genotypes other than D). Virological response was achieved in 39/54 (72%) patients and was not associated with baseline escape mutation ($p=0.7$), RT mutations (6/9, 67%, vs. 29/37, 78.4%, $p=0.46$) and HBV genotype ($p=0.33$).

In our cohort, the prevalence of escape mutations was 16.6%. Virological response was not affected by the presence of escape mutations.

Corresponding author:

Laura Ambra Nicolini, PhD
Infectious Diseases Unit
Ospedale Policlinico
San Martino-IRCCS
Genoa, Italy

lauraambra.nicolini@hsanmartino.it

Keywords:

Hepatitis B virus;
mutazioni *escape*;
risposta virologica

Potenziali conflitti

di interesse: nessuno

JHA 2022; 7(1): 19-22

DOI: 10.19198/JHA31530

Introduzione

L'infezione da virus dell'epatite B (HBV) è un problema di salute pubblica globale la cui epidemiologia è profondamente influenzata da politiche vaccinali e, in minor misura, da flussi migratori. In base alle stime della World Health Organization (WHO), la prevalenza globale dell'infezione da HBV (definita dalla positività dell'antigene S, HBsAg) è risultata pari a 3,9% nel 2016, corrispondente a 290 milioni di persone affette. Inoltre, la mortalità globale correlata all'infezione da HBV è aumentata del 33% dal 1999 al 2013, superando i 680.000 casi l'anno (1).

In considerazione della morbilità e mortalità correlate all'infezione cronica da HBV, il WHO ha inserito l'eliminazione di HBV tra i propri obiettivi da raggiungere entro il 2030 (2). Questo obiettivo è oggi considerato realizzabile grazie alle terapie antivirali esistenti, in grado di controllare la replicazione virale e quindi ridurre la contagiosità dei pazienti che vivono con infezione da HBV, e grazie all'esistenza di misure di profilassi attiva e passiva efficaci, in primis la vaccinazione per HBV (1). Possibili ostacoli al raggiungimento di questi obiettivi sono :1) la persistenza permanente del cccDNA di HBV all'interno del nucleo dell'epatocita ospite, che costituisce una riserva per la riattivazione della replicazione virale; 2) l'alto grado di variabilità genetica, guidato dalla mancanza di funzione di rilettera (proof-reading) della trascrittasi inversa dell'HBV ed esacerbato dall'alta velocità del ciclo di replicazione. Questo alto grado di variabilità genetica dell'HBV consente al virus di reagire a pressioni selettive endogene, del sistema immunitario, ed a pressioni esogene (come la vaccinazione, il trattamento con immunoglobuline anti-HBV e con farmaci antivirali) mediante la modulazione della propria struttura genomica (3). Tra le diverse proteine di HBV, l'antigene (HBsAg) contiene la principale regione idrofila (major hydrophilic region, MHR), epitopo dominante cruciale per il legame a neutralizzanti anticorpi. Dalla scoperta della prima mutazione *escape*, la G145R, nel 1988, sono state identificate 30 mutazioni del MHR. Sebbene il loro impatto clinico sia in gran parte sconosciuto, le possibili implicazioni di un cambiamento conformazionale di HBsAg indotto dalla presenza di mutazioni *escape* sono molteplici. In particolare, potrebbero ridurre o eludere la capacità neutralizzante degli anticorpi anti-HBsAg (HBsAb), di consentire l'infezione persistente da HBV e di promuovere la fitness virale, rendendo inefficace

la vaccinazione. Inoltre, potrebbero favorire la riattivazione dell'HBV durante immunosoppressione (3). Infine, uno studio ha correlato la presenza di mutazioni *escape* con il rischio di insorgenza di insufficienza epatica acuta in pazienti con infezione cronica da HBV (4).

L'obiettivo primario di questo studio è valutare la prevalenza di mutazioni *escape* in una coorte di pazienti con infezione cronica da HBV. Obiettivi secondari dello studio sono valutare la correlazione tra la presenza di mutazioni *escape* e la risposta virologica alla terapia con analoghi nucleosidici (NA) ad alta barriera genetica e la correlazione con il genotipo (GT) di HBV.

Materiali e Metodi

Studio di coorte retrospettivo. Sono stati valutati i pazienti con HBV cronica afferenti al Centro di Malattie Infettive del Policlinico San Martino tra il 2014 e il 2018 che hanno ricevuto trattamento con entecavir (ETV) o Tenofovir (TDF) in monoterapia o in terapia di associazione ed in cui è stato effettuato un sequenziamento HBV.

Dal punto di vista sierologico, sono state raccolte sierologie di HBV eseguite al baseline e durante il trattamento antivirale. In particolare, è stata valutata la positività/negatività dei marcatori HBsAg, HbsAb, HbeAg, HbeAb, HbcAb, IgMHbcAb, oltre a HBV-DNA.

Per i pazienti con mutazioni *escape*, sono state valutate le caratteristiche demografiche (sesso, età alla diagnosi, regione di provenienza, modalità di acquisizione) e la presenza di coinfezioni virali (in particolare virus dell'immunodeficienza umana, HIV, e virus dell'epatite C, HCV).

Sono stati analizzati i sequenziamenti HBV effettuati allo scopo di valutare il GT di HBV e la presenza di mutazioni dei geni S e RT. Data la natura retrospettiva dello studio, i sequenziamenti ottenuti ed analizzati sono quelli eseguiti in caso di: 1) paziente candidabile a terapia con interferone, per valutare la presenza di genotipo A o B, in cui tale approccio terapeutico avrebbe avuto maggiori possibilità di risposta; 2) paziente in terapia antivirale con risposta virologica parziale o breakthrough virologico. La risposta virologica alla terapia è stata definita secondo le linee guida della EASL. In particolare, in corso di terapia con analoghi nucleo(s)tidici è stata definita risposta virologica la presenza di HBV-DNA non rilevabile (< 15 UI/mL) entro 12 mesi dall'inizio della terapia.

L'estrazione di HBV-DNA virale per il sequenziamento è stata effettuata con l'estrattore automatico EZ1® Advanced XL con il kit EZ1® DSP Virus (Qiagen). La carica virale HBV in Real-Time PCR fino a novembre 2017 è stata eseguita usando il kit Artus® HBV RG PCR (Qiagen). In seguito, è stata usata la metodica Versant HBV DNA 1.0 Assay (kPCR) (Siemens HealthCare Diagnostics). Per la determinazione del genotipo e il rilevamento delle mutazioni del gene S (che trascrive per HBsAg) e della polimerasi fino al 2015 è stato utilizzato il kit Trugene® HBV Genotyping (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY). Dopo un aggiornamento tecnologico le sequenze sono state ottenute con l'uso di metodiche "home made" nella prima fase di amplificazione, mentre nell'ultime fasi di sequenziamento è stato utilizzato il kit Abbott HBV Sequencing (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL) in grado sia di determinare i diversi genotipi di HBV (A-J) sia di rilevare le mutazioni nella regione dell'HBsAg e del gene RT/Pol. Infine l'analisi delle sequenze è stata eseguita per mezzo dell'analizzatore genetico ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), mentre la determinazione del genotipo e delle mutazioni sono state ottenute inserendo le sequenze in formato FASTA nel database Geno2pheno[hbv]2.0 (<http://www.geno2pheno.org>).

Analisi Statistica

Le variabili categoriche sono state comparate utilizzando i test del Chi quadrato e il test esatto di Fisher, mentre i test T di Student e Mann Withney, ove applicabili, sono stati utilizzati per comparare le variabili continue. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. Le variabili correlate agli *outcome* clinici con $p < 0.1$ alla regressione logistica univariata sono state inserite in analisi multivariata.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando SPSS versione 20.0 (IBM corporation, New York, NY, USA).

Risultati

In totale, dal 2014 al 2018, 143 pazienti con infezione cronica da HBV sono stati seguiti attivamente presso la Clinica di Malattie infettive del Policlinico San Martino-IST. In 70/143 (49%) casi è stato effettuato un sequenziamento HBV durante la presa in carico ambulatoriale.

Di questi, 54 (36%) rispondevano ai criteri di inclusione dello studio, in quanto avevano iniziato tera-

pia antivirale nel corso del follow up ambulatoriale. Il sequenziamento HBV è stato effettuato in 46/54 (85%) casi prima di iniziare terapia antivirale con TDF o ETV, mentre nei casi rimanenti è stato effettuato in corso di terapia. La maggior parte dei pazienti aveva infezione da HBV GT D (36/54, 66.6%) e GT A (11/54, 20.4%).

Inoltre, 16/54 (29.6%) presentavano HBeAg positività alla presa in carico presso il nostro centro. Nove (16.6%) pazienti presentavano almeno una mutazione *escape*, di cui due avevano più di una mutazione. Otto pazienti avevano mutazioni *escape* pre-terapia.

Per quanto riguarda il tipo di terapia antivirale ricevuta, 30 pazienti hanno ricevuto in prima linea TDF (n=12) o ETV (n=13) in monoterapia o TDF in associazione con lamivudina/emtricitabina (n=4, tutti pazienti con coinfezione HIV). Ulteriori 17 pazienti hanno ricevuto uno di questi farmaci in seconda linea dopo fallimento virologico ad altra strategia terapeutica, mentre i rimanenti pazienti li hanno ricevuti come terza linea o successiva.

Tutti i pazienti con mutazioni *escape* avevano HBeAg negativo prima di ricevere NA ($p=0.044$). La presenza di mutazioni *escape* non è risultata correlata al GT HBV D (4/36, 11%, vs. 5/18, 27.7%, $p=0.14$, mutazioni *escape* in GT D vs. nonD). La risposta virologica, raggiunta in 39/54 (72%) pazienti, non è risultata correlata significativamente con la presenza di mutazioni sul dominio RT e di mutazioni *escape* al basale (6/9, 67%, vs. 29/37, 78.4%, $p=0.46$, e 6/9, 75%, vs. 33/45, 73%, $p=0.7$, rispettivamente in pazienti con o senza mutazioni RT e mutazioni *escape*) o con il GT D (24/36, 66.6%, GT D vs. 15/18, 83.3%, non-D, $p=0.33$).

Infine, selezionando i pazienti che avevano mutazioni *escape* al basale, non abbiamo osservato correlazione significativa tra risposta virologica e GT, mutazioni *escape* e mutazioni RT.

Discussione

La prevalenza di mutazioni *escape* nella nostra coorte è risultata pari a 16.6%, inferiore a quanto riportato in precedenza in letteratura. In precedenza, Colagrossi et al. hanno rilevato una prevalenza di mutazioni *escape* del 22% in una coorte europea di pazienti con infezione da HBV (5). La principale differenza rispetto al nostro studio è da attribuire ai criteri di inclusione dei pazienti in quanto i pazienti selezionati da Colagrossi et al. avevano effettuato il

sequenziamento HBV in qualsiasi momento della terapia, non distinguendo quindi tra test effettuati al baseline e quelli effettuati durante la terapia antivirale (5). Il nostro studio ha voluto invece concentrarsi sulle mutazioni presenti al baseline della terapia con ETV e/o TDF. Questa decisione si è basata sul fatto che le mutazioni *escape* potrebbero essere selezionate dal trattamento con analoghi nucleosidici come effetto di mutazioni compensatorie, risultato di adattamento del genoma virale a una pressione esogena (6). Inoltre, rispetto al nostro studio, Colagrossi *et al.* avevano selezionato una coorte europea di pazienti già esposti a terapia antivirale, in cui il 44% presentava status HBeAg positivo al baseline e il 40% presentava infezione da HBV genotipo A. Infine, contrariamente alla nostra esperienza, Colagrossi *et al.* evidenziavano una correlazione tra genotipo A e presenza di mutazioni *escape* (5). La distribuzione dei genotipi HBV evidenziata nella

nostra coorte è risultata simile a quanto descritto in letteratura, e conferma una prevalenza di genotipo D seguito dal genotipo A nonostante la crescente diffusione degli altri genotipi non prettamente endemici dovuti ai flussi migratori (7).

Un interessante dato di questo studio è la presenza di correlazione significativa tra presenza di mutazioni *escape* e stato sierologico negativo al baseline. Infatti, tutti i pazienti che presentavano mutazione *escape* avevano HBeAg negativo. In letteratura non ci sono studi che dimostrino una simile correlazione. Ulteriori studi sono necessari per approfondire questa correlazione. Infine, nel nostro studio non abbiamo rilevato differenze in termini di risposta terapeutica in pazienti con e senza mutazioni *escape* né un'associazione tra queste e la presenza di mutazioni del dominio RT. In base a questi dati, l'approccio al trattamento antivirale non dovrebbe essere influenzato dalla presenza di queste mutazioni. ■

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti con mutazioni *escape* e tipo di mutazioni rilevate.

Paziente	Età	Sesso	HBeAg pre-terapia	genotipo HBV	Numero di linee terapeutiche HBV effettuate	tipo prima linea terapeutica effettuata	Mutazioni <i>escape</i>	Mutazioni RT
#1	41	M	negativo	D	1	Entecavir	129H	0
#2	43	M	negativo	D	4	Entecavir	120S*	0
#3	34	M	negativo	A	1	Tenofovir disiprossil	120P, 120T	0
#4	54	F	negativo	D	1	Entecavir	123A, 130R	0
#5	75	F	negativo	A	2	Lamivudina	P120T	0
#6	49	M	negativo	A	3	Lamivudina	145A	181V, 236T
#7	48	F	negativo	B	2	Telbivudina	122K	0
#8	19	M	negativo	E	1	Tenofovir disiprossil	100C	0
#9	61	M	negativo	D	2	Tenofovir disiprossil	144G	180V

BIBLIOGRAFIA

1. Polaris Observatory Collaborators. *Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study.* Lancet Gastroenterol Hepatol. 2018; 3: 383-403.
2. World Health Organization. *Global hepatitis report, 2017.* 2017. 62 p. Last access 20 February 2022 at <https://www.who.int/publications/i/item/global-hepatitis-report-2017>
3. Nicolini LA, Orsi A, Tatarelli P, Viscoli C, Icardi G, Sticchi L. *A Global View to HBV Chronic Infection: Evolving Strategies for Diagnosis, Treatment and Prevention in Immunocompetent Individuals.* Int J Environ Res Public Health. 2019; 16: 3307.
4. Gao S, Joshi SS, Osiowy C, Chen Y, Coffin CS, Duan Z-P. *Chronic hepatitis B carriers with acute on chronic liver failure show increased HBV surface gene mutations, including immune escape variants.* Virol J. 2017; 14: 203.
5. Colagrossi L, Hermans LE, Salpini R, et al. *Immune-escape mutations and stop-codons in HBSAg develop in a large proportion of patients with chronic HBV infection exposed to anti-HBV drugs in Europe.* BMC Infect Dis. 2018; 18: 251.
6. Alavian S.M., Carman W.F., Jazayeri S.M. *HBSAg variants: Diagnostic-escape and diagnostic dilemma.* J. Clin. Virol. 2013; 57: 201–208.
7. Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F. *Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: Revised classification hurdles and updated resolutions.* World J Gastroenterol. 2014; 20: 7152–7168.