



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN METODOLOGIE IN MEDICINA  
PREVENTIVA E TERAPIA

"CICLO XX"

Titolo della tesi:

**“Studio pilota prospettico per testare l’efficacia  
dell’immunoprofilassi attiva mediante schedula di vaccinazione  
rinforzata e a lungo termine con vaccino ricombinante S in  
combinazione con lamivudina ed immunoglobuline anti-HBs  
(HBIg) come strategia di prevenzione della ricorrenza di infezione  
da virus dell’epatite B in pazienti sottoposti a trapianto di fegato  
per malattia HBV correlata”**

Nome e Cognome del dottorando:  
Dott. Daniele Di Paolo

Docente Guida/Tutor: Prof. Mario Angelico

Coordinatore: Prof. Giovanni Rocchi

**Parole chiave:**

1. HBV: Hepatitis B virus (Virus dell'epatite B)
2. OLT: Orthotopic Liver Transplantation (Trapianto ortotopico di fegato)
3. HBIg: Hepatitis B Immunoglobulins (Immunoglobuline anti-HBs)
4. Recidiva di infezione da HBV post-OLT
5. Profilassi della ricorrenza di infezione da HBV post-OLT
6. Lamivudina
7. Vaccino anti-HBV
8. HBsAg (Antigene HBs sierico)
9. Anti-HBs (Titolo anticorpale anti-HBs sierico)
10. HBV-DNA (Dosaggio di HBV-DNA sierico)

## Abstract (in Italiano)

**Background:** l'immunoprofilassi attiva dopo trapianto di fegato con il vaccino ricombinante HBsAg è una potenziale strategia di prevenzione della ricorrenza di infezione da HBV dopo trapianto di fegato per malattia HBV-correlata. Studi precedenti sull'impiego della vaccinazione standard hanno mostrato risultati controversi, mentre l'utilizzo del nuovo adiuvante 3-deacilato-monosforil-lipide-A (MPL) ha incrementato in modo molto significativo la percentuale di risposta in termini di produzione anticorpale anti-HBs. **Obiettivo:** lo scopo principale è stato quello di testare l'efficacia di una schedula di vaccinazione rinforzata, a lungo termine (12 mesi) ed accelerata (dosi mensili) utilizzando il vaccino ricombinante S con e senza la concomitante somministrazione di Immunoglobuline anti-HBs (HBIg). **Metodi:** sono stati arruolati 18 pazienti (M/F:13/5) trapiantati di fegato per cirrosi HBV-correlata e follow-up dal trapianto di  $73\pm 38$  mesi. Tutti i pazienti erano HBsAg e HBV DNA negativi nel sangue e cccDNA negativi nel fegato; 5 (27,7%) erano co-infetti con HCV e 6 (27,7%) con HDV. Il protocollo di studio prevede 12 dosi di vaccino somministrate mensilmente e per via intramuscolare (HBsAg 20 $\mu$ g e MPL 50 $\mu$ g) insieme alla Lamivudina (100 mg/die). Ciascuna delle prime 6 dosi di vaccino (primo ciclo) è stata somministrata entro i 7 giorni successivi alla somministrazione per via endovenosa di 2000 UI di HBIg, mentre le successive 6 dosi di vaccino sono state somministrate dopo la completa sospensione delle HBIg (secondo ciclo). Il titolo di anti-HBs è stato misurato prima di ciascuna dose di vaccino e durante il follow-up. Tutti i pazienti erano mantenuti con terapia immunosoppressiva a basse dosi. **Risultati:** tutti i pazienti hanno completato l'intero programma di vaccinazione (primo e secondo ciclo/fase), ed hanno ricevuto 12 dosi di vaccino adiuvato da MPL e sono stati monitorati durante i primi 3 mesi di follow-up. Non è stato riportato alcun evento avverso, né alcun caso di ricorrenza di infezione da HBV. Alla fine del primo ciclo di vaccinazione 17/18 (94,4%) pazienti avevano un titolo di anti-HBs superiore a 100 IU/L ( $389\pm 445$  UI/L) e 2 (11,1%) un titolo superiore a 500 UI/L. Alla fine del follow-up 9/18 (50%) and 3/18 (16,6%) avevano un titolo di anti-HBs superiore a 100 IU/L ( $510\pm 427$  UI/L) e 500 UI/L, rispettivamente. **Conclusioni:** 9 mesi dopo la sospensione delle HBIg la metà dei pazienti ha raggiunto e mantenuto un titolo anticorpale protettivo di anti-HBs (>100 UI/L). Questa schedula di vaccinazione con il vaccino ricombinante S adiuvato da MPL e rinforzata, somministrata in combinazione con HBIg e Lamivudina, sembra essere più efficace delle precedenti schedule vaccinali anti-HBV standard fino ad ora testate, e si attende la conferma di tale efficacia al termine di un follow-up più lungo.

## **Abstract (in Inglese)**

**Background:** Post-transplant active immunization with HBsAg vaccine is a potential prophylaxis strategy against HBV-recurrence after liver transplantation due to HBV-related disease. Previous studies showed conflicting results using standard vaccines, whereas the use of the new adjuvant 3-deacylated monophosphoryl-lipid-A (MPL) significantly increased patient's immunization rate through an high anti-HBs titre increase. **Aim:** We investigated the efficacy of a long-term (12 months) accelerated (monthly doses) reinforced vaccination schedule using the MPL-adjuvanted recombinant S vaccine administered with and without concomitant HBIg. **Methods:** 18 patients (M/F:13/5) transplanted for HBV-related cirrhosis 73±38 months earlier were recruited. All were HBsAg and HBV DNA negative in serum and cccDNA negative in liver tissue; 5 (27.7%) were co-infected with HCV and 5 (27.7%) with HDV. Study protocol consisted of 12 consecutive monthly intramuscular vaccine doses (HBsAg 20µg plus MPL 50µg) given together with lamivudine (100 mg/daily). Each of the initial 6 doses (first cycle) was administered within 7 days after 2000 IU HBIg i.v. infusion, while the last 6 doses were given after complete HBIg withdrawal (second cycle). HBsAb titre was determined before each vaccine dose and during the follow-up. All patients were maintained on low-level immunosuppression. **Results:** all patients completed the whole vaccination program, receiving 12 adjuvanted vaccine doses (first and second cycles) and were monitored during 3 months follow-up after vaccination end. No side effects occurred, nor evidence of HBV recurrence. At the end of first cycle 17/18 (94.4%) patients achieved an anti-HBs titre greater than 100 IU/L (mean 389±445 IU/L) and 2 (11.1%) a titre greater than 500 IU/L. At the end of follow-up 9/18 (50%) and 3/18 (16,6%) had an anti-HBs titre greater than 100 (mean 510±427 UI/L) and 500 IU/L, respectively. **Conclusions:** nine months after HBIg withdrawal half of the patients reached and maintained a protective anti-HBs titre (>100 IU/L). This intensive schedule using the MPL-adjuvanted recombinant S vaccine, given in combination with HBIg and lamivudine, seems to be more effective than previous HBV vaccination protocols, although a longer follow-up is needed to assess its final effectiveness.

## INDICE GENERALE

### 1. Introduzione

- 1.1 l'infezione cronica da HBV e le attuali terapie antivirali.....pag. 6
- 1.2 trapianto di fegato per malattia HBV correlata.....pag. 17
- 1.3 recidiva di infezione da HBV post-trapianto di fegato per malattia HBV correlata.....pag. 25
- 1.4 strategie di prevenzione della ricorrenza di infezione e malattia da HBV post-trapianto di fegato per malattia HBV correlata.....pag. 30

### 2. Protocollo di studio

- 2.1 disegno e criteri di arruolabilità/esclusione.....pag. 45
- 2.2 metodologia.....pag. 48
- 2.3 risultati.....pag. 52
- 2.4 discussione.....pag. 57

### 3. Bibliografia.....pag. 64

- 4. **Publicazioni** sotto forma di abstract, poster, lavoro per esteso e comunicazioni orali a convegni negli anni accademici di dottorato 2004/05, 2005/06, 2006/07.....pag. 81

## **1. BACKGROUND**

### **1.1 L'infezione cronica da HBV e le attuali terapie antivirali**

Dal punto di vista epidemiologico, l'infezione da virus dell'epatite B (HBV) e la patologia ad esso correlata ha ancora oggi una diffusione ubiquitaria essendo presente a tutte le latitudini e carattere endemico in molti paesi con livello socio-economico più basso [1]. Si stima che HBV infetta più di 350 milioni di soggetti nel mondo [2], causando l'epatite che può avere le caratteristiche delle forme acuta o fulminante e cronica [3]; quest'ultima con elevata incidenza di evoluzione in cirrosi o epatocarcinoma [4]. I fattori che influenzano in modo più significativo la percentuale di cronicizzazione dell'infezione sono l'età al momento del primo contatto con HBV e la via di trasmissione [5]. Infatti, si stima che la cronicizzazione raggiunga il 90% nel periodo perinatale, il 25% nell'età infantile e se la modalità di infezione è quella materno-fetale [5]. Tale percentuale scende al di sotto del 10% se l'infezione è contratta in età adulta e per mezzo delle vie sessuale o parenterale (tossicodipendenza o trasfusione di derivato ematico) [5].

Nei paesi "occidentali" la modalità di trasmissione prevalente è mutata negli ultimi 15 anni [6], passando dalla cosiddetta epatite trasfusionale "da siringa", cioè l'infezione contratta con trasfusione di derivati ematici ricevuti da portatori di HBV in epoche in cui mancavano controlli sistematici di pazienti e derivati ematici, e l'utilizzo del monouso, ad una prevalenza della trasmissione parenterale nell'ambito del fenomeno della tossicodipendenza e della trasmissione sessuale (42, 15, e 21% per il contatto eterosessuale, omosessuale e tossicodipendenza, rispettivamente) [7].

Fin dalla seconda metà degli anni 80 si è assistito ad un calo macroscopico del numero dei nuovi casi di infezione nei paesi in cui è stata resa obbligatoria la vaccinazione in età neonatale ed infantile [8], nonché nelle categorie a rischio (operatori sanitari o socialmente impegnati), nei soggetti tossicodipendenti che afferiscono alle strutture sanitarie territoriali dedicate ed nei detenuti [9].

La patogenesi del danno epatico in corso di epatite B è esclusivamente di tipo immuno-mediato [10,11]. Infatti HBV è un virus a DNA [12] che, anche se possiede il meccanismo della

retrotrascrizione e somiglia molto nel suo ciclo riproduttivo ad un virus ad RNA, esprime la sua patogenicità in modo indiretto, venendo classificato per questo nel gruppo dei virus citopatici, che in sintesi portano a morte la cellula infettata attraverso l'espressione di proteine virus-specifiche che fungono da bersaglio dell'immunità cellulo-mediata [10,11]. Dunque, la patogenesi di HBV si esprime principalmente attraverso l'azione dei linfociti T-citotossici (CD8+) sensibilizzati dagli antigeni virali S e C [10,11]. La citolisi degli epatociti infetti e la conseguente liberazione di nuove particelle virali complete di HBV, permette la circolazione intraepatica del virus, l'arrivo del virus nel sangue ed il successivo ingresso di HBV anche in cellule "non epatiche" (linfociti periferici e cellule ematopoietiche midollari) [13,14]. Inoltre, le cellule T CD8+ sensibilizzate producono Interferon (IFN)- $\gamma$  e Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ , che rapidamente eliminano il nucleocapside ed il loro contenuto a DNA replicante dal fegato [15]. Tutti i prodotti genici di HBV, incluso l'RNA virale, i loro prodotti di trascrizione e gli intermedi replicativi di DNA sono suscettibili dell'azione inibente di queste citochine, che quindi svolgono un'importante azione antivirale. Il bilanciamento tra l'effetto citolitico e quello curativo antivirale dei linfociti CD8+ determina gran parte del danno epatico in corso di infezione acuta o cronica da HBV [13,14].

Dunque la malattia da HBV si sviluppa in molteplici direzioni a seconda dell'equilibrio/interazione che si crea tra l'ospite con il suo sistema immune ed il virus [13,14]. I possibili scenari di patologia che ne derivano comprendono, l'epatite acuta o fulminante (forme di epatite itterica a transaminasi molto elevate, che a volte determinano uno stato di grave insufficienza epatica caratteristicamente a rapida evoluzione), lo stato di portatore inattivo (HBsAg positività nel siero, bassi livelli di replicazione virale con HBV-DNA <math>10^4</math> log di copie/ml, transaminasi persistentemente normali, assenza di fibrosi a livello epatico), l'epatite cronica attiva (HBsAg positività nel siero, livelli variabili di replicazione virale con HBV-DNA >math>10^4</math> log di copie/ml, transaminasi al di sopra del valore normale, gradi variabili di fibrosi a livello epatico), la cirrosi e l'infezione occulta (persistenza del virus in forma latente come DNA "covalently closed circular" o cccDNA non integrato nel DNA dell'epatocita senza evidenza di

infezione sistemica, HBsAg negatività nel siero, positività di HBcAb isolata nel siero, assenza di replicazione virale e di malattia epatica) [3,16]. La cronicizzazione dell'infezione è ritenuta in gran parte secondaria allo sviluppo di una immunodepressione virus-specifica e virus-indotta, che si traduce in una grave iporesponsività e riduzione della reattività dei linfociti T, principalmente CD8+, ma in parte anche CD4+. Tuttavia, al momento attuale non è noto se questo fenomeno è la conseguenza dell'elevata viremia e facilita solamente la cronicizzazione, o rappresenta la causa diretta della cronicizzazione stessa [10,11,17].

Dunque, la risposta immune dell'ospite con il suo stato di immunocompetenza o immunosoppressione, ed eventualmente la presenza di cofattori di malattia epatica come il consumo di alcool, le malattie metaboliche, la infezione con HCV, HDV o HIV, l'esposizione cronica a farmaci epatotossici, rappresentano i principali fattori che condizionano o comunque influenzano in modo significativo la storia naturale dell'infezione cronica da HBV [18].

Terapie immunosoppressive, malattie oncoematologiche, insufficienza renale terminale, trapianto di organi e tutti i fattori che inducono uno stato di immunocompromissione, favoriscono l'incremento significativo della replicazione virale e l'aumento del numero degli epatociti infetti; tale condizione, una volta che si ricostituisce la capacità di risposta immune, si può tradurre in una massiva citolisi degli epatociti infetti con un "flare" di transaminasi più o meno rilevante, fino allo sviluppo in alcuni casi di forme di epatite ad impronta colestatica/fibrosante che il più delle volte si trasformano in epatite fulminate e portano a morte il soggetto a meno che non si effettui il trapianto di fegato [19]. Questa condizione può essere oggi prevenuta, impostando preventivamente la corretta terapia antivirale con analoghi nucleos(t)idici al momento dell'instaurarsi della condizione di immunodepressione [20].

Generalizzando, l'evoluzione immunopatogenetica dell'infezione da HBV dal contagio all'eventuale cronicizzazione può essere suddivisa in quattro fasi [3]. La prima fase si caratterizza per una elevata capacità replicativa del virus, a cui corrisponde una carica virale medio/alta nel sangue ed una relativa tolleranza immunologica con ridotti livelli di citolisi epatica e quindi di transaminasi, che di solito sono normali o "near normal" [21]. Nell'infezione acuta,



questa fase corrisponde a quella di incubazione, ma nel caso dell'infezione perinatale, questo periodo può durare anche molti anni [22]. La seconda fase, si caratterizza per la prevalenza della risposta immunologia virus-specifica e può corrispondere alla risoluzione dell'infezione acuta o alla cronicizzazione [23,24]. Di solito la viremia si riduce e le transaminasi, sempre espressione e surrogato di citolisi epatica, si elevano. Nei pazienti con infezione cronica, questa seconda fase può durare anche decenni ed esitare nella guarigione spontanea, evento raro, o nella cirrosi o nell'epatocarcinoma. La terza fase, che più frequentemente segue quanto è stato riportato, coincide con la riduzione degli epatociti infetti e con un controllo più efficiente dell'infezione da parte del sistema immunitario. Tale fase, caratterizzata dunque da una bassa o assente carica virale circolante e dalla normalità delle transaminasi, coincide con lo stato di portatore inattivo. Infine, la quarta fase dell'infezione, rappresenta l'evento ultimo dell'evoluzione dell'infezione e coincide con la cosiddetta "guarigione spontanea". Sierologicamente si caratterizza per la perdita dell'HBsAg, lo sviluppo di un titolo anticorpale di HBs stabilmente superiore a 10 IU/L, la persistente negatività dell'HBV-DNA (negatività dell'analisi quantitativa e qualitativa dell'HBV-DNA in PCR o "polymerase chain reacton") e l'assenza di segni biochimici di malattia epatica. Recenti evidenze, ottenute dalla ricerca con metodiche di PCR avanzate (real-time o nested) ha permesso di scoprire che una percentuale variabile, ma stimabile fino al 37% dei soggetti [25], rimane portatore di HBV sotto forma di cccDNA, presentando le caratteristiche del soggetto guarito con le ovvie ricadute in termini di prevenzione della sempre possibile ripresa dell'infezione in caso di grave immunocompromissione o trasmissione dell'infezione in caso di donazione di organi e/o tessuti [16]. Si calcola che complessivamente l'incidenza media di guarigione spontanea è dell'1-2% per anno; tale incidenza si riduce nei soggetti immunocompromessi e nelle infezioni congenite a trasmissione verticale, nonché nelle forme acquisite nei primi anni di vita [26].

Da tempo si riconosce l'importanza di suddividere l'epatite B nelle forme HBeAg positiva e negativa [27]. Le due forme sono indotte da un ceppo virale "wild" o con mutazione "pre-core" (sostituzione in posizione G1896A della regione pre-core), rispettivamente. L'assenza o la

presenza di tale mutazione nel genoma di HBV si traduce nella capacità o meno di produrre e secernere l'HBsAg [28]. Nelle forme HBeAg positive, di solito, la fine della seconda fase e la terza fase si caratterizzano anche per la sieroconversione HBeAg/HBeAb, quindi con la scomparsa dell'antigene "e" e la comparsa dell'anticorpo [27]. Tale suddivisione, oltre ad avere una importanza epidemiologica ancora oggi in sostenuto cambiamento (massima prevalenza delle forme HBeAg negative in nord Europa e USA e delle forme HBeAg positive in Asia ed Africa), rimane di grande ed attuale rilevanza per variabilità della risposta virologica alle diverse terapie antivirali attualmente disponibili tra le due forme [29].

E' oramai ampiamente dimostrata l'elevata capacità di HBV, specie nelle forme croniche di infezione, di andare incontro a mutazioni genetiche più o meno significative dal punto di vista clinico e/o terapeutico. Queste mutazioni, nel tempo, portano alla differenziazione e coesistenza di genomi virali varianti o di quasi-specie virali nello stesso ospite portatore di HBV. Pur considerando la presenza di una variabilità spontanea di HBV, di solito prevalgono nel determinismo delle mutazioni virali, la pressione selettiva esercitata dalle terapie antivirali. La mutazione più nota che conferisce resistenza al farmaco è quella YMDD a carico della DNA polimerasi virale (trascrittasi inversa) indotta dall'analogo nucleosidico lamivudina in percentuale variabile e crescente al prolungarsi del trattamento.

Gli strumenti diagnostici attualmente utilizzati per la rilevazione dell'infezione da HBV e la successiva caratterizzazione del virus e della specifica ed individuale forma di epatite sono: i marcatori sierologici (HBsAg, HBsAb, HBcAb IgM e IgG, HBeAg, HBeAb, il dosaggio ematico del virus (HBV-DNA qualitativo e quantitativo), il monitoraggio sequenziale a cadenza variabile degli indici di citolisi (AST o GOT e ALT o GPT) e di colestasi (GGT, bilirubina) epatici, l'ecografia epatica (valutazione dell'ecopattern, di eventuali segni di evoluzione della malattia e di modularità espressione di epatocarcinoma o noduli di rigenerazione) e la biopsia epatica (valutazione oggettiva e quantitativa di infiammazione e fibrosi) [3]. A questi esami standard, oggi, devono essere aggiunti, il sequenziamento del genoma virale, sempre più di routine per l'individuazione di eventuali mutazioni che inducono farmaco-resistenza e la ricerca qualitativa

di forme di persistenza del virus B nel fegato, di cui il cccDNA ne rappresenta il principale target utile in specifici casi.

L'approccio clinico di massima si può sintetizzare come segue. La positività per HBsAg indica la presenza del virus, lo status HBeAg indica la sottoclasse di virus infettante, e l'HBV-DNA indica la presenza ed il grado di replicazione virale (assente, basso o elevato se l'HBV-DNA è al di sotto del limite di sensibilità della metodica,  $\leq 10^4$  copie/ml o  $>10^4$  copie/ml di virus, rispettivamente). Successivamente, in caso di infezione attiva (HBV-DNA positività) è di fondamentale importanza distinguere tra le forme di epatite a transaminasi persistentemente normali o elevate (anche ad andamento fluttuante con periodiche normalizzazioni), in quanto in quest'ultimo caso il paziente è a rischio di evoluzione della malattia a prescindere da ogni altro elemento caratterizzante paziente e malattia [3].

L'ecografia offre uno strumento non invasivo insostituibile per la prima stadiazione della malattia, per il follow-up successivo (indicato ogni 6-12 mesi) e per l'accertamento di una condizione di evoluzione in cirrosi. La biopsia epatica, indicata sempre nelle forme di epatite cronica attiva a transaminasi elevate salvo in presenza di fattori di rischio aggiuntivi che elevano il rischio di complicanze secondarie alla procedura, offre comunque l'unica possibilità con i più elevati livelli di sensibilità e specificità di effettuare la valutazione prognostica del grado di fibrosi epatica [3].

La cirrosi epatica HBV-correlata, ed in particolare la forma avanzata di malattia, richiede in ogni caso un trattamento antivirale con il primo obiettivo di rendere non quantificabile l'HBV-DNA sierico. Questo per interrompere la progressione o lo scompenso della malattia e ove rimangano le indicazioni, per rendere possibile il trapianto di fegato. Infatti, la positività dell'HBV-DNA rappresenta oggi una controindicazione quasi assoluta al trapianto, in quanto il rischio di ricorrenza di infezione e malattia da HBV dopo l'intervento rimane troppo elevato nonostante l'impiego di programmi di prevenzione efficaci [18].

Lo stato di portatore cronico di HBV rappresenta uno dei maggiori fattori di rischio per lo sviluppo dell'epatocarcinoma (HCC) e si stima che nel 40 % dei casi insorge in pazienti non

cirrotici [30]. Tuttavia il rischio di sviluppo di HCC si eleva di molto quando si sviluppa la cirrosi [31]. Infatti, l'incidenza annua di HCC varia da 0,2% per i pazienti non cirrotici, al 2-3% per i pazienti che hanno sviluppato cirrosi [32].

L'obiettivo principale di una terapia antivirale nel trattamento dell'epatite cronica B è la definitiva eliminazione di HBV. Tale risultato si traduce nella sierconversione HBsAg/HBsAb, o meglio nella perdita dell'HBsAg e nella formazione di anticorpi anti-HBs. Tale risultato può essere raggiunto solo in una minoranza di pazienti; per tale motivo si considera di primaria importanza l'ottenimento di una risposta virologica sostenuta (SVR o "sustained virological response"), che corrisponde alla persistente negatività dell'HBV-DNA sierico ed alla normalizzazione delle transaminasi, oltre il 6° mese di follow-up dal termine della terapia [3].

Poiché tale obiettivo non è sicuramente perseguibile nel caso della malattia HBV-correlata evoluta in cirrosi, in questo caso l'obiettivo principale è ottenere il persistente controllo della malattia attuabile attraverso una duratura inibizione della replicazione virale. Nelle forme di cirrosi compensata questo si traduce in un miglioramento della sopravvivenza ed in un allungamento del tempo di sviluppo dell'indicazione al trapianto di fegato. Nel caso della cirrosi scompensata, rende possibile, ove ci sia l'indicazione, il trapianto di fegato, mediante il raggiungimento della negatività dell'HBV-DNA prima del trapianto stesso [3].

I meccanismi di azione antivirale dei farmaci attualmente disponibili per la terapia dell'infezione da HBV sono fondamentalmente due. Il primo, di tipo immunomodulante, prevede la stimolazione del sistema immune verso l'eliminazione diretta delle cellule infette da parte dei linfociti T citotossici e verso il miglioramento della capacità difensiva specifica del resto del sistema immune, cellulare ed umorale. Il secondo, di tipo antivirale diretto su HBV, sfrutta la capacità di ridurre la replicazione virale attraverso un'azione inibente diretta sulla DNA polimerasi virale. Con la prima classe di farmaci si può ottenere la guarigione intesa come sierconversione HBsAg/HBsAb e la SVR, mentre con la seconda l'inibizione più o meno completa della replica virale per lunghi periodi.

Il primo obiettivo è perseguibile unicamente con l'Interferone-alfa, oggi considerato la terapia di primo livello in tutte forme di epatite cronica B attive a transaminasi persistentemente elevate e con potenziale evolutività. Si utilizza l'interferone pegilato alfa-2a (Peg-IFN) sia per le forme HBeAg positive che negative [33]. Il risultati dei trials clinici con il Peg-IFN hanno riportato percentuali di SVR e di sieroconversione HBsAg/HBsAb pari al 34% e 1.9% nelle forme HBeAg positive, e pari a 19% e 3.3% nelle forme HBeAg negative, rispettivamente. La combinazione del Peg-IFN con l'analogo nucleosidico lamivudina non ha mostrato un aumento significativo delle percentuali di SVR [34,35]; pertanto, ad oggi, il protocollo di trattamento universalmente accettato prevede l'utilizzo del Peg-IFN alfa 2a al dosaggio di 180 mcg a settimana in monoterapia per 48 settimane. Lo stato di evoluzione in cirrosi rappresenta una controindicazione all'utilizzo del Peg-IFN, specie se in fase avanzata, per la ridotta tollerabilità e l'elevato rischio di riduzione della funzione epatica residua e di scompenso della malattia.

Diverso è il profilo terapeutico ed in parte l'utilizzo della seconda categoria di farmaci antivirali oggi disponibili nel trattamento dell'epatite cronica B, gli analoghi nucleosidici. Questi farmaci, si caratterizzano per l'elevato profilo di tollerabilità, di gran lunga più elevato rispetto al Peg-IFN, tanto da poter essere utilizzati anche e soprattutto nella cirrosi scompensata. Inoltre, si distinguono per l'elevata efficacia nell'inibizione della replicazione virale, in tempi di solito rapidi, fino al 70% dei casi entro il 3° mese di trattamento, con minime differenze tra le diverse molecole. Gli aspetti negativi di tali farmaci sono fondamentalmente due. Il primo risiede nella totale incapacità di indurre guarigione, per cui il paziente permane HBsAg positivo e nel 100% dei casi [34,35] ed alla sospensione dell'antivirale si ha una ripresa della replicazione virale, con un "flare" di epatite, di transaminasi ed in caso di cirrosi, una rapida progressione verso la forma scompensata [36]. Il secondo fattore limitante risiede nella variabile, ma spesso elevata, incidenza di resistenza virale farmaco-indotta dipendente in modo più o meno proporzionale dal tempo di assunzione del farmaco.

Gli analoghi nucleos(t)idici presentano una chiara azione immunomodulante, che in gran parte si esprime attraverso l'inibizione della replicazione virale. Infatti è dimostrato che al crescere della

carica virale, si riduce la capacità di risposta cellulo-mediata verso HBV ed in modo proporzionale si ha un recupero della funzione linfocitaria al ridursi dei livelli di HBV-DNA nel sangue [37].

La Lamivudina è stato il primo analogo nucleosidico disponibile per il trattamento dell'infezione cronica da HBV ed è il farmaco di questa categoria di cui possediamo dati con più lungo follow-up [38,39]. E' un potente inibitore della replicazione di HBV e HIV, sia in vitro che in vivo. L'eliminazione è quasi esclusivamente renale ed il dosaggio standard di 100 mg al giorno, deve essere ridotto per livelli di clearance della creatinina inferiori a 50 ml/min. I campi di utilizzo sono in ordine di priorità di indicazione i seguenti: cirrosi epatica, epatite cronica attiva a carattere evolutivo non trattabile con l'interferone o non responder a precedenti trattamenti, la prevenzione della riacutizzazione dell'infezione cronica da HBV in caso di immunocompromissione iatrogena o indotta da patologia, prevenzione della recidiva di infezione da HBV post-trapianto di fegato per malattia HBV-correlata o nei pazienti riceventi un organo da donatori anti-HBc positivi [33].

La Lamivudina, rispetto a tutte le altre molecole oggi utilizzate, possiede la maggiore incidenza di mutazioni virali farmaco-indotte che conferiscono resistenza all'antivirale ed inducono nella quasi totalità dei casi "flares" di epatite [40]. Si calcola che la percentuale di sviluppo di resistenza alla Lamivudina sia proporzionale al tempo di utilizzo del farmaco e che si avvicini al 100% dei casi al 5° anno di trattamento in monoterapia (23, 46, 55, 71, 65 % a 1, 2, 3, 4, 5 anni rispettivamente) [40]. La resistenza si sviluppa per mutazioni che si ritrovano nella sequenza YMDD, dominio C, del gene della DNA polimerasi virale. Tra tutte la M204I, la L528M e la M552V sono le più frequenti [41].

L'emergenza di mutanti resistenti alla Lamivudina è generalmente associata ad un "flare" della malattia, con un aumento dei livelli sierici dell'HBV-DNA e di transaminasi [36,38,40], ed in caso di cirrosi, la riduzione della funzione epatica fino alla comparsa di ittero, delle complicanze della malattia e di segni di scompenso idro-elettrolitico, con notevole peggioramento della prognosi e riduzione della sopravvivenza [36,40,42].

L'Adefovir dipivoxil è stato introdotto circa 3 anni dopo la Lamivudina e differisce da questa quasi esclusivamente per il profilo di efficacia e di resistenza [43]. Infatti, tale analogo possiede una potenza antivirale, in termini di inibizione della replica virale, sensibilmente più bassa rispetto alla Lamivudina e verso tutti gli altri antivirali sviluppati successivamente. Possiede una grande efficacia su HBV mutato e resistente alla Lamivudina, per cui è considerata la terapia "rescue" in caso di sviluppo di mutante YMDD. Il profilo di sicurezza e di tollerabilità di Adefovir è paragonabile a quello della Lamivudina, mentre la percentuale di farmaco-resistenza anch'essa proporzionale al periodo di trattamento è minore. Si calcola che l'incidenza delle mutazioni a carico del gene della DNA polimerasi virale, in un locus differente da quello interessato in caso resistenza alla Lamivudina, sia di 0, 5, 11, 18, e 28 % a 1, 2, 3, 4 e 5 anni di trattamento rispettivamente [44]. La N236T e A181V sono le mutazioni più frequenti (locus B e D del gene della polimerasi virale) e non presentano cross-resistenza con la maggior parte delle mutazioni indotte dagli altri analoghi nucleosidici. Dunque la monoterapia con Adefovir non è considerata efficace, mentre lo standard è rappresentato dalla combinazione con un altro analogo nucleosidico. Questa di solito si effettua con la Lamivudina dopo lo sviluppo della resistenza alla Lamivudina stessa o precocemente prima che si sviluppi resistenza nei pazienti con una prospettiva di trattamento a lungo termine [45]. Infatti, l'incidenza di resistenza alla Lamivudina ed all'Adefovir è di gran lunga superiore per entrambe i farmaci se utilizzati in monoterapia rispetto alla combinazione [46,47].

Dunque, il mantenimento della Lamivudina dopo lo sviluppo della resistenza, concetto che vale per tutti gli analoghi nucleosidici, trova il suo presupposto nella persistenza di parte di HBV non mutato verso cui il farmaco continua a svolgere il suo effetto, nella riduzione del rischio di resistenza verso l'analogo nucleosidico aggiunto e nel mantenere comunque un freno alla replicazione virale durante la fase iniziale della combinazione, fase in cui un farmaco più lento come l'Adefovir potrebbe caratterizzarsi per il raggiungimento di livelli viremici molto elevati e una progressione rapida di malattia. La scelta dell'Adefovir come analogo nucleosidico di prima linea è limitata anche dal costo elevatissimo di tale terapia. Oggi l'Adefovir trova la sua

indicazione d'uso in tutti i casi di infezione cronica da HBV resistente alla Lamivudina, sia in fase di epatite cronica prima o dopo il trapianto di fegato, che di cirrosi compensata o scompensata.

Da pochi mesi è entrato in commercio in Europa l'analogo nucleosidico Entecavir, che presenta un profilo di efficacia, tollerabilità e sicurezza paragonabile a quello della Lamivudina, ma un profilo di resistenza molto più basso. A 2 anni di utilizzo in monoterapia, Entecavir determina una percentuale nulla di resistenza [48]. Tuttavia l'efficacia si riduce molto sui mutanti resistenti alla Lamivudina, in cui il rischio di sviluppo di resistenza ad Entecavir è più elevato [49] ed il costo è paragonabile a quello di Adefovir.

Sono in fase di studio Tenofovir [50] e Telbivudina [51], di cui attendiamo i dati relativi soprattutto al profilo di resistenza.

Dunque, se la combinazione di Peg-IFN ed analoghi nucleosidici, che è ancora in fase di valutazione per gli altri analoghi disponibili dopo la Lamivudina, non ha aumentato l'efficacia dell'interferone, diversamente ci si sta sempre di più indirizzando verso la combinazione di almeno due analoghi nucleosidici fin dalle fasi più precoci del trattamento dell'infezione cronica da HBV. Questo soprattutto per elevare la barriera genetica di HBV ed abbattere il tasso di incidenza delle mutazioni farmaco-indotte che conferiscono resistenza alla terapia [33].

Infine, sono state descritte altre mutazioni di HBV che ne modificano il potenziale di malattia. Queste mutazioni, più rare, si sviluppano a carico del gene S e sono indotte dalla pressione selettiva esercitata dalla somministrazione a lungo termine delle immunoglobuline anti-HBs (HBIG). Questo si può verificare in particolare nel paziente trapiantato di fegato per malattia HBV correlata che possieda ancora HBV in forma latente e che riceve come da protocollo le HBIG a lungo termine come strategia di prevenzione della ricorrenza di infezione. Lo sviluppo di tali mutanti a carico della regione determinante "a" del gene S (sostituzione in posizione 145, G145R), è uno dei meccanismi noti di recidiva di infezione post-trapianto, anche se si riconosce responsabile di questo solo in una piccola percentuale di pazienti con recidiva di malattia da HBV post-trapianto di fegato [52,53].



## 1.2 Trapianto di fegato per malattia HBV correlata

Il trapianto di fegato rappresenta oggi l'unica opzione terapeutica in grado di migliorare in modo significativo la prognosi della cirrosi epatica scompensata e della maggior parte delle malattie epatiche acute caratterizzate da un andamento rapidamente progressivo verso l'insufficienza epatica terminale [54]. In Italia le malattie di fegato in stadio terminale, potenzialmente curabili con il trapianto di fegato, rappresentano un rilevante problema di sanità pubblica. Secondo quanto riportato recentemente, su di un campione di 3026 pazienti trapiantati di fegato dal 1983 al 1999, l'eziologia virale da parte dei virus dell'epatite B e C, è quella prevalente, con una percentuale complessiva pari al 59,4 % dei casi [54]. Negli ultimi 10 anni l'infezione da HCV ha di fatto raggiunto la percentuale di gran lunga più rilevante, e si calcola che HCV, HBV e le coinfezioni rappresentano rispettivamente il 34,5 %, 21,7 % e 3,2 % delle indicazioni consolidate al trapianto di fegato nell'adulto. Tuttavia, anche se l'epidemiologia ci indica una diminuzione della prevalenza dell'infezione da HBV, in particolare nel mondo occidentale dove è stata possibile una diffusione capillare della vaccinazione anti-HBV, la cirrosi da virus B mantiene significativa la sua incidenza proprio nei soggetti che 2 o 3 decenni fa hanno contratto l'infezione. Dunque il trapianto di fegato per malattia da virus dell'epatite B rappresenta un capitolo ancora molto rilevante nel trattamento della epatopatia cronica virale evoluta in cirrosi.

Considerando l'epatocarcinoma (HCC) come indicazione indipendente al trapianto, nella maggior parte dei casi insorto in pazienti con cirrosi virale, si calcola che il 18% dei pazienti vengono trapiantati per l'insorgenza di HCC, che al momento della valutazione soddisfano ancora i criteri per l'immissione in lista di trapianto di fegato, detti anche "criteri di Milano" (1 nodulo <5 cm di diametro o massimo 3 noduli ciascuno di diametro non superiore a 3 cm) [55]. Tali criteri di Milano rimangono gli unici parametri validati in studi prospettici e nell'esperienza dei maggiori centri. L'applicazione di tali criteri comporta una sopravvivenza del paziente a 5 anni pari a circa il 70% ed una percentuale di ricorrenza del tumore inferiore al 25% [55]. Le

epatiti fulminanti, di cui il maggior numero è ancora secondario ad HBV, sono il 4,9% delle indicazioni al trapianto [54].

Nel nostro Paese il trapianto di fegato, nato di fatto negli anni ottanta, ha incontrato una forte crescita soprattutto nel corso degli anni novanta [56]. Superata questa fase di crescita esponenziale del numero dei trapianti in Italia, nel 2000, si è sentita la necessità di affrontare a livello nazionale alcuni dei problemi che erano diventati più scottanti, come l'età massima per la candidabilità al trapianto, le indicazioni consolidate o marginali ed i nuovi cambiamenti intercorsi, i criteri minimi per l'immissione in lista di trapianto, il donatore marginale e il matching donatore-ricevente, il ritrapianto, il trapianto da donatore vivente, la nuova promulgazione della legge sul silenzio-assenso, la gestione multidisciplinare dei pazienti trapiantati ed il ruolo del Centro Nazionale Trapianti (CNT) nell'ambito del trapianto di fegato.

La cirrosi epatica da HBV è un'indicazione consolidata al trapianto di fegato. In Italia nel periodo 1983-1999 la sopravvivenza a 5 e 10 anni è risultata rispettivamente 72% e 71% [54].

Questi ottimi risultati sono frutto principalmente della prevenzione della recidiva di malattia con l'immunoprofilassi dopo trapianto che, sebbene attualmente sia in corso di ridefinizione in relazione alla disponibilità di nuovi farmaci (analoghi nucleos(t)idici), deve essere allo stato attuale proseguita indefinitamente. Occorre un'accurata selezione dei candidati in relazione alla viremia prima del trapianto, poiché la riattivazione virale è predetta dalla presenza di livelli sierici pre-operatori di HBV-DNA elevati (superiori a  $10^6$  copie/mL con metodica PCR) [57].

L'introduzione degli analoghi nucleosidici/nucleotidici (Lamivudina/Adefovir) capaci di abbattere la viremia prima del trapianto ha virtualmente esteso l'accessibilità al trapianto a tutti i pazienti con cirrosi HBV-correlata che ne abbiano l'indicazione, indipendentemente dalla carica virale iniziale [58,59]. Nella pratica si controindica il trapianto a pazienti con HBV-DNA positività e viremia superiore a  $10^5$  copie/mL [60]. E' tuttavia indispensabile che l'indicazione alla terapia antivirale pre-trapianto sia posta in accordo con il centro trapianti di riferimento, soprattutto in relazione alla prevedibile tempistica del trapianto stesso ed al rischio di insorgenza di mutanti virali farmaco-resistenti. I pazienti con cirrosi HDV correlata seguono gli stessi criteri

di selezione e profilassi indicati per l'HBV [54]. In genere questi pazienti sono HBV-DNA negativi ed il trattamento con analoghi nucleos(t)idici non è indicato [61].

Per l'immissione in lista di trapianto di fegato sono stati stabiliti i criteri minimi validi a livello nazionale, ma che in linea di massima coincidono con quelli assunti nel resto del mondo [62]. Classe di Child-Turcotte-Pugh (CPT) B (score  $\geq 7$ ) od almeno un episodio di scompenso recente (ascite, sanguinamento da varici, peritonite batterica spontanea) anche con CPT  $< 7$ , sono ritenuti i requisiti minimi per la cirrosi epatica di qualunque eziologia, per considerare un paziente per l'inserimento in lista di attesa per trapianto di fegato. Per quanto riguarda l'HCC, anche in assenza di segni clinici di severità di malattia, rappresentano criteri minimi per l'immissione in lista, la presenza di noduli singoli o multipli di HCC all'interno dei criteri convenzionali di trapiantabilità (criteri di Milano) non curabili con metodiche ablative.

L'età massima per considerare ancora l'indicazione al trapianto di fegato è stata finora arbitrariamente stabilita a 60 anni. Tale indicazione non ha valore assoluto, non si basa su criteri clinici, piuttosto su criteri etici per la scarsità di organi. Sono stati segnalati, tuttavia, una maggiore incidenza di neoplasie maligne ed una più bassa sopravvivenza per i pazienti sottoposti a trapianto di fegato di età superiore a 60 anni ed oltre [63,64].

La disponibilità di farmaci antivirali dotati di potente attività anti-HBV ha rivoluzionato il trapianto e la prognosi del paziente sottoposto a trapianto di fegato per malattia HBV correlata [59]. La combinazione pre-emptive con Lamivudina allo scopo di ridurre la replicazione virale pre-trapianto ed il trattamento profilattico con HBIg e Lamivudina nel post-trapianto, hanno ridotto il rischio di recidiva di malattia da HBV a meno del 5%, anche in pazienti con alti livelli di HBV-DNA all'immissione in lista [65-67]. I pochi casi di recidiva di infezione post-trapianto ancora segnalati sono da attribuirsi al trapianto di pazienti che hanno sviluppato resistenza clinica alla Lamivudina (HBV-DNA  $> 10^5$  copie/mL) nell'immediato pre-trapianto. I pazienti che sviluppano resistenza clinica alla Lamivudina devono essere sospesi dalla lista, avviati ad un trattamento di "rescue" con farmaci efficaci anche su ceppi virali Lamivudina resistenti, quali l'Adefovir [68]. Questi pazienti possono essere rimessi in lista trapianto quando i livelli di

viremia scendono al di sotto di  $10^5$  copie/mL, anche se ad oggi ancora non è stato definito il livello di viremia al di sotto del quale sia possibile trapiantare questi pazienti con sicurezza assoluta. Dopo il trapianto di fegato, questi pazienti devono continuare il trattamento triplice (HBIg, Lamivudina ed Adefovir), pur tenendo conto che circa il 15% dei pazienti trattati con Adefovir ed inibitori della calcineurina ha un aumento della creatinina sierica tale da rendere necessaria la riduzione o la sospensione dell'Adefovir. Sono necessari ulteriori studi per definire se la triplice terapia nei pazienti trapiantati con resistenza alla Lamivudina sia veramente necessaria in tutti i pazienti o se sia possibile identificare un sottogruppo di pazienti in cui si possano sospendere uno o più farmaci.

Tutti i pazienti post-trapianto sono attualmente in trattamento profilattico per prevenire la recidiva di infezione da HBV. Alcuni sono in trattamento solo con HBIg; si tratta soprattutto di pazienti trapiantati prima del 1997 e/o affetti da patologie che si associano a bassi livelli di HBV-DNA pre-trapianto, quali cirrosi HDV o epatite fulminante da HBV. Molti sono in trattamento con HBIg e Lamivudina, soprattutto pazienti trapiantati dal 1997 ad oggi per patologie associate ad HBV con livelli di HBV-DNA medio/alti pre-trapianto, quali la cirrosi HBV, HBeAg positiva o negativa. Un terzo gruppo di pazienti sono quelli trapiantati dal 2001 ad oggi per cirrosi HBV con lamivudina-resistenza e sono in trattamento con HBIg, Lamivudina ed Adefovir.

Il monitoraggio dell'epatite B post-trapianto si basa essenzialmente sulla determinazione di HBsAg/anti-HBs e sulla valutazione quantitativa del titolo di anti-HBs. La frequenza della determinazione del titolo anti-HBs ed i livelli al di sopra dei quali mantenere il titolo dipendono dal tempo trascorso dal trapianto, dallo status di replicazione di HBV pre-trapianto e dall'eventuale coinfezione con HDV o epatite fulminante da HBV. Il mantenimento di livelli di anti-HBs superiori a 200-400 UI/L e determinazioni ogni 1-2 mesi sono un programma ragionevole nella maggior parte dei pazienti; tuttavia se le HBIg vengono somministrate in associazione alla Lamivudina e/o Adefovir possono essere mantenuti livelli di anti-HBs anche minori (100-150 IU/L) [69]. La determinazione dell'HBV-DNA sierico prima del controllo routinario annuale, va riservata a condizioni particolari: ad esempio, nel primo mese post-

trapianto nei pazienti ad elevato rischio di recidiva da HBV o in pazienti con abnorme consumo di anti-HBs o in pazienti nei quali sia necessario sospendere uno o più farmaci anti-HBV o in altri casi particolari.

Dunque, il trapianto di fegato per malattia HBV correlata rappresenta oggi la terapia più efficace per il trattamento dell'insufficienza epatica determinata dall'infezione da virus dell'epatite B e lo è diventato grazie alla disponibilità ed il successivo miglioramento delle terapie immunosoppressive, grazie ai progressi delle tecniche chirurgiche degli ultimi 20 anni e soprattutto alla messa a punto di efficaci strategie di prevenzione della recidiva di infezione e malattia dopo il trapianto. Infatti, tra le diverse complicanze o fattori di malattia che possono limitare la prognosi del trapianto di fegato per questa indicazione c'è la ricorrenza della malattia di base che se non identificata e curata precocemente, si caratterizza per una prognosi severa [70]. In particolare si può dire che i risultati del trapianto di fegato per malattia da virus B sono stati da sempre determinati prima di tutto dal problema della ricorrenza di infezione da HBV post-trapianto. Infatti la recidiva di infezione da HBV a cui si accompagna quasi inevitabilmente una epatite che può avere un andamento acuto, subacuto, cronico, o rapidamente progressivo con danno irreversibile dell'organo trapiantato sottoforma di epatite a rapida evoluzione (epatite colestatica fibrosante), si caratterizza in quasi tutti i casi per una prognosi severa in assenza di un adeguato trattamento antivirale con analoghi nucleos(t)idici [70-72].

In Europa il 10% dei trapianti di fegato sono effettuati per malattia HBV correlata cronica o fulminante [73,74]. Attualmente, la sopravvivenza complessiva dei trapianti per malattia da virus dell'epatite B varia dal 90-95% a 1 anno al 65-80% a 5-10 anni dal trapianto [75]. L'evoluzione positiva ed il miglioramento della sopravvivenza che c'è stato in questo campo ha raggiunto oggi un livello così elevato che, sia negli Stati Uniti che in Europa, la sopravvivenza post-trapianto calcolata per eziologia mostra chiaramente una netta superiorità dei trapianti per malattia HBV correlata rispetto a quelli per malattia da HCV [76].

Fino a circa quindici anni fa ed in particolare prima dell'introduzione delle immunoglobuline anti-HBs e delle altre strategie di prevenzione della recidiva di infezione post-trapianto, la cirrosi

da virus dell'epatite B specie se attiva (HBV-DNA positività) costituiva una controindicazione al trapianto di fegato per l'elevata incidenza di ricorrenza di malattia, la cui storia naturale è resa ancor più aggressiva e rapidamente evolutiva dalle terapie immunosoppressive. Nei primi anni 90 si calcolava che in assenza di un'adeguata profilassi il rischio di reinfezione dell'organo trapiantato era dell'ordine dell'80%, con una correlazione stretta con i livelli di replicazione virale e quindi di attività dell'infezione prima del trapianto stesso [70,71].

Oggi numerosi studi, anche a lungo termine, confermano che l'introduzione dell'immunoprofilassi specifica ha rappresentato la svolta decisiva che di fatto ha reso possibile il trapianto per questa indicazione e successivamente i dati sono migliorati ulteriormente con l'associazione di antivirali come la Lamivudina, che in questo particolare contesto può svolgere anche un importante effetto di prevenzione della ricorrenza dell'infezione da HBV [77].

Dunque, l'immunoprofilassi a lungo termine e l'utilizzo degli analoghi nucleos(t)idici prima del trapianto ed in combinazione con le HBIG nel post-trapianto hanno migliorato radicalmente la sopravvivenza, portandola a livelli anche superiori a quelli delle altre indicazioni al trapianto di fegato.

E' oramai ampiamente noto che la Lamivudina, considerata la terapia antivirale di prima linea nella cirrosi da HBV attiva, è penalizzata dall'elevato rischio di mutazioni virali che inducono resistenza al farmaco con perdita dell'efficacia antivirale. Poiché questo evento per il paziente cirrotico rappresenta un fattore prognostico molto negativo e per il paziente in lista di trapianto determina di fatto l'esclusione dal programma trapiantologico, prima della disponibilità di farmaci alternativi molto efficaci come l'Adefovir, si ponevano non pochi interrogativi sulla migliore gestione del primo trattamento antivirale e del timing di immissione in lista. Per questo molti pazienti fino a non molto tempo fa, non hanno potuto ricevere dell'unica opzione di trattamento in grado di migliorare radicalmente la prognosi dell'epatopatia di base per l'insorgenza di resistenza alla Lamivudina.

Dunque, possiamo dire che le tappe fondamentali nella storia dei trapianti di fegato per malattia HBV correlata sono state le seguenti:

- utilizzo delle HBIg per la prevenzione della recidiva di infezione post-trapianto
- avvento della Lamivudina per il trattamento dell'infezione attiva da HBV in pazienti con cirrosi scompensata
- messa a punto di strategie di prevenzione post-trapianto di combinazione di HBIg e della Lamivudina
- disponibilità dell'Adefovir per il trattamento dell'infezione da HBV resistente alla Lamivudina sia prima che dopo il trapianto

Molto è migliorato anche nelle conoscenze e nell'utilizzo dei donatori con markers positivi per HBV. La presenza di anti-HBc tra i potenziali donatori ha un'incidenza variabile da paese a paese (3-9% negli USA, 12% in Spagna, 7% in Francia, 9% in Giappone e più del 50% in Cina), con una tendenza all'incremento con l'aumento dell'età (27% nei donatori con più di 60 anni in Spagna) [78]. In passato la maggior parte dei centri trapianto ha preferito non utilizzare questi organi per rischio di trasmettere l'infezione, tranne che in situazioni di emergenza. Non esistono evidenze di un rischio incrementato di epatite B post-trapianto nei riceventi HBsAg positivi che ricevono un fegato da donatore anti-HBc positivo e vengono sottoposti alla profilassi post-trapianto con HBIg e/o Lamivudina [78]. In contrasto, l'utilizzo di organi anti-HBc positivi in riceventi HBsAg negativi si associa ad un rischio di epatite B (de novo) post-trapianto strettamente connesso allo stato immunitario del ricevente nei confronti dell'HBV [78,79]. Il rischio è elevato (33-75%) nei riceventi completamente negativi per i marcatori anticorpali di HBV (gruppo 1) [79-81] e basso (0-13%) nei riceventi con marcatori anticorpali di pregresso contatto con HBV, anti-HBc positività o anti-HBc/anti-HBs positività (gruppo 2) [78]. Quest'ultimo dato è confermato dalla recente segnalazione di una scarsissima probabilità di recidiva epatitica in riceventi di trapianto epatico portatori occulti di HBV (costantemente HBsAg negativi e positivi per l'anti-HBc, portatori o meno dell'anti-HBs), anche in assenza di profilassi specifica post-trapianto [78-81]. Il rischio è virtualmente nullo nei riceventi vaccinati (gruppo 3) che abbiano manifestato una risposta anticorpale significativa e nei portatori del solo

anti-HBs in assenza di anti-HBc [78-82]. Ne consegue un'indicazione alla profilassi con HBIg e Lamivudina nel primo gruppo ed alla profilassi con le sole HBIg o con la sola Lamivudina nel secondo e terzo gruppo. Nel terzo gruppo, in alternativa, è stato anche proposto il semplice monitoraggio virologico [78].

Nel bacino del Mediterraneo da 1 a 1,5% dei potenziali donatori ha un'infezione attiva da HBV (HBsAg positività) e tali donatori hanno un'elevatissima probabilità di trasmettere l'infezione nel post-trapianto. Pertanto, in linea teorica, l'utilizzo di donatori HBsAg positivi dovrebbe essere ristretto solo esclusivamente ai riceventi HBsAg positivi e solo in casi estremi a riceventi HBsAg negativi [83,84]. Non esistono, tuttavia, ad oggi, dati pubblicati sulla capacità protettiva dei diversi strumenti di profilassi e l'utilizzo di questi organi nei riceventi HBsAg positivi è ottenibile solo all'interno di trials clinici.



### **1.3 Recidiva di infezione da HBV post-trapianto di fegato**

La recidiva di infezione da HBV post-trapianto si caratterizza per una prognosi severa nella maggior parte dei casi che non effettuano terapia anti-virale specifica. L'utilizzo sistematico delle HBIg, fin dalla fase anepatica dell'intervento e a lungo termine, ha rappresentato la strategia di prevenzione che ha reso possibili i trapianti per malattia da HBV, abbattendo in modo significativo il rischio di reinfezione nel post-trapianto.

I meccanismi attraverso i quali le HBIg proteggono nei confronti della reinfezione dell'organo trapiantato da parte del virus dell'epatite B non sono ben noti. Quello più probabile, e che almeno nei primi mesi post-trapianto sembra il più rilevante, è il blocco "neutralizzante" delle particelle virali residue circolanti attraverso un legame specifico, una volta tolto il grande serbatoio di virus che è rappresentato dal fegato cirrotico espantato. Ma si ipotizza anche un legame in grado di neutralizzare il virus rilasciato da siti extraepatici di localizzazione virale, evento possibile in qualunque fase precoce o tardiva post-trapianto. Ci sono evidenze, che andrebbero supportate da dati di maggiore significatività, circa un effetto protettivo dose-dipendente delle immunoglobuline anti-HBs soprattutto nei primi mesi dopo il trapianto [57], e comunque l'uso a breve termine delle HBIg ha dato risultati complessivamente negativi, con elevate percentuali di recidiva di infezione [57,70-76].

Dunque, si ipotizza che la ricorrenza dell'infezione e della malattia da HBV nel post-trapianto di fegato sia la conseguenza di una precoce e rapida reinfezione dell'organo trapiantato da parte di particelle virali circolanti, o da parte di virus proveniente da siti di localizzazione virale extraepatici o entrambe i meccanismi. Verosimilmente nei pazienti che ricevono le HBIg, la recidiva di infezione è prevalentemente la conseguenza di una produzione di virus dai siti extraepatici [85], a cui possono aver contribuito la presenza di un livello troppo basso, non protettivo, di anticorpi anti-HBs circolanti o l'emergenza di ceppi mutanti nel gene S e in particolare nella regione determinate "a", che riduce l'affinità di legame tra antigene e anticorpo S. Quest'ultima circostanza sembra essere favorita dalla pressione selettiva esercitata dalle immunoglobuline stesse [52,53,86-88].

Chiaramente il meccanismo della mutazione nel gene S non è l'unico rilevante nel determinismo della reinfezione dell'organo trapiantato, in quanto sono state descritte recidive post-trapianto con HBV non mutato in pazienti che ricevevano HBIg ad alto titolo [52,86].

La maggior parte dei casi di recidiva da virus B nel post-trapianto insorge nei primi 6-12 mesi, ma solitamente non oltre i 3 anni dall'intervento, manifestandosi con la ricomparsa dell'HBsAg nel siero, con l'elevato consumo di anticorpi anti-HBs e con la presenza di elevati livelli di replicazione virale [89]. Tale fenomeno è stato descritto per la prima volta da Davies nel 1991 come una forma aggressiva di epatite definita "colestatica fibrosante", che portava rapidamente a morte nell'arco di pochi mesi [90]. Una evoluzione così rapida e severa rappresenta l'estremo più grave di una varietà di forme cliniche di epatite B post-trapianto ed è verosimilmente legata alla elevata quantità di virus intraepatico e che si manifesta attraverso un meccanismo di danno citopatico diretto. Questa elevata quantità di particelle virali sarebbe favorita largamente dalla terapia immunosoppressiva, di cui è ben noto l'effetto inducente sulla replicazione virale [89-92]. Per tale motivo, già da molti anni la maggior parte dei centri trapianti adotta la pratica di non utilizzare o ridurre e poi sospendere la terapia steroidea il prima possibile, magari entro il 3° mese dal trapianto [93]. Questo oggi è reso molto più agevole dalla disponibilità di immunosoppressori efficaci da associare se indicato all'inibitore delle calcineurine.

Si è visto che l'epatite B post-trapianto può intervenire anche in pazienti che prima del trapianto erano HBsAg negativi, quindi per nuova acquisizione del virus dal soggetto donatore attraverso il trapianto [94]. L'incidenza dell'epatite "de novo" varia dal 2 al 8% dei casi di epatite B post-trapianto ed è di solito legata alla trasmissione del virus da donatori HBsAg negativi e HBcAb positivi [95,96], ma è possibile anche da donatori sierologicamente negativi per pregressa infezione da HBV "occulta". Sebbene sono state riportate forme di epatite "de novo" aggressive ed a rapida evoluzione [97], la storia naturale dell'infezione di questo tipo di epatite B post-trapianto è di solito più benigna di quella descritta per la ricorrenza di epatite. Per i pazienti con apparente infezione acquisita "de novo" che hanno replicazione virale attiva e danno epatico, il trattamento con Lamivudina sia in monoterapia che in combinazione con altri analoghi

nucleos(t)idici è sempre indicato ed il regime terapeutico consigliato è sovrapponibile a quello descritto per ricorrenza di epatite B.

La terapia di elezione dell'infezione da HBV post-trapianto è quella antivirale con analoghi nucleos(t)idici, di cui la Lamivudina è il maggior rappresentante e di cui si dispone di maggiori dati e più lungo follow-up. I risultati indicano una grande efficacia antivirale ed un significativo miglioramento della progressione di malattia e della sua storia naturale, almeno a breve e medio termine; mancano dati significativi a lungo termine.

Oggi, sono disponibili anche altri analoghi, quali l'Adefovir, l'Entecavir ed il Tenofovir, di cui il primo è sicuramente quello più indicato nella maggior parte dei casi. Infatti, la quasi totalità delle ricorrenze di infezione sono determinate da HBV resistente alla Lamivudina, su cui Adefovir ha la massima attività antivirale in virtù dell'assenza di cross-resistenza, diversamente da Entecavir.

Ci sono studi pubblicati sia americani che europei che hanno mostrato l'efficacia della Lamivudina nel trattamento dell'infezione da HBV post-trapianto per malattia HBV correlata [98-100].

Poiché la terapia con interferone ha un profilo di efficacia e di tollerabilità particolarmente basso in questo ambito ed aumenta il rischio di rigetto [101], è sempre in atto una continua ricerca di nuovi analoghi nucleos(t)idici che sempre meglio riescano a coniugare l'elevata efficacia antivirale e l'ottimo profilo di tollerabilità con la più alta barriera genetica ottenibile. Una elevata percentuale di risposta biochimica, virologica ed istologica in termini di riduzione dello score di infiammazione, è stata ottenuta non solo in pazienti con epatite cronica B post-trapianto, ma anche nei casi di epatite colestatica fibrosante [102]. Complessivamente gli studi dimostrando una negativizzazione dell'HBV-DNA nel 68-100% dei pazienti trattati per periodi di 12-36 mesi [99-106]. Anche in questo contesto, l'incidenza di mutanti virali YMDD positivi farmaco-indotti dalla Lamivudina, specie se utilizzata in monoterapia, è tempo-dipendente e si caratterizza per una ripresa dell'attività replicativa del virus ed il successivo "flare" di malattia [99,107-110]. A causa di una sovrapposizione nelle "open reading frames" (processi di traduzione e sintesi proteica) di HBV, i cambiamenti dei nucleotidi nella polimerasi virale possono risultare in

cambiamenti degli aminoacidi non solo nella proteina polimerasi, ma anche nella proteina di superficie che potrebbe teoricamente alterare il legame con le HBIg [107].

L'Adefovir si è dimostrato efficace su HBV mutato e resistente alla Lamivudina sia in vitro che in vivo, suggerendo che Adefovir è il farmaco di prima scelta nel trattamento dell'infezione da HBV post-trapianto di fegato in pazienti precedentemente in trattamento o in profilassi con Lamivudina [111,112]. I dati disponibili sul trattamento dell'epatite B post-trapianto resistente alla Lamivudina con Adefovir [112-114], seppur con follow-up limitati, hanno mostrato la superiorità della combinazione con la Lamivudina, rispetto alla monoterapia, soprattutto nei confronti dell'incidenza di mutazioni che conferiscono resistenza all'Adefovir stesso. L'esperienza con Entecavir o con Tenofovir [115] è troppo limitata per suggerirne un utilizzo più allargato fuori da trial clinici.

L'Adefovir può aggravare un quadro di insufficienza renale pre-esistente e nel caso dei pazienti trapiantati di fegato, l'incidenza di tossicità renale è più elevata rispetto ai pazienti con funzione renale normale e non in trattamento con inibitori delle calcineurine o altri farmaci nefrotossici [112]. I risultati più significativi sul trattamento della ricorrenza di malattia da HBV con la combinazione di Lamivudina ed Adefovir sono disponibili nello studio di Schiff et al., che ha arruolato circa 200 pazienti [68]. A 48 settimane di trattamento il 34% dei pazienti ha negativizzato l'HBV-DNA e il 49% ha normalizzato le ALT. La riduzione media dell'HBV-DNA rispetto al baseline è stata di 4.3 log ed il miglioramento dei principali indici biochimici di funzione epatica è stato riportato nella maggior parte dei pazienti. La sopravvivenza ad un anno è stata del 93%. Solo l'11% (6/196) dei pazienti ha avuto un incremento significativo dei valori di creatinina sierica, ma in tutti i casi era presente una riduzione della funzione renale prima della terapia con Adefovir, determinata dall'utilizzo di farmaci nefrotossici (nella maggior parte dei casi inibitori delle calcineurine come Ciclosporina e Tacrolimus) o da preesistenti malattie renali. In nessun caso c'è stata la necessità di sospendere la terapia antivirale per il peggioramento della funzione renale. In tutti i casi la tollerabilità è stata molto elevata e nessun paziente ha sviluppato resistenza genotipica e/o clinica ad Adefovir. Dunque, il trattamento della recidiva di infezione

da HBV post-trapianto di fegato è oggi un problema di gran lunga minore rispetto al passato. Se il paziente ha ricevuto la profilassi con la combinazione di HBIg e Lamivudina, l'Adefovir con il mantenimento a lungo termine della Lamivudina rappresenta la terapia di prima scelta, con un monitoraggio attento della funzione renale.

La trascrizione dell'RNA pre-genomico a partire dalla forma cccDNA è considerato uno dei passaggi critici per l'amplificazione del genoma virale ed alla fine determina la presenza e la velocità della replicazione virale. La persistenza di cccDNA all'interno degli epatociti in forma non integrata, è fondamentale per il mantenimento dell'infezione e per la ripresa della replicazione virale attiva in generale e nello specifico nel post-trapianto di fegato per malattia HBV correlata [116]. È stato dimostrato che HBV cccDNA è la forma di persistenza di HBV ("infezione occulta") relativamente insensibile agli analoghi nucleos(t)idici ed il punto di partenza della riattivazione dell'infezione nel paziente affetto da epatite cronica B in cui viene sospesa la terapia antivirale [116]. A 10 anni di follow-up dal trapianto per malattia HBV correlata, 44 pazienti senza evidenza di reinfezione sono stati testati per HBV-DNA su siero e 28 di questi anche per cccDNA su leucociti periferici e tessuto epatico [117]. Bassi livelli di HBV-DNA sono stati ritrovati in 18 (41%) pazienti; di questi 12 e 9 erano anche positivi per l'HBV-DNA nei leucociti e nel fegato, rispettivamente. Un paziente era positivo per l'HBV-DNA nei leucociti e nel fegato ma non nel siero. Tutti sono risultati negativi per cccDNA su tessuto epatico. Questo studio dimostra come HBV possa persistere fino a 10 anni dal trapianto in una percentuale non trascurabile di pazienti che non mostrano una recidiva clinica di malattia da HBV, ma in cui sicuramente la combinazione di HBIg e Lamivudina come strategia di prevenzione deve essere protratta a vita [117]. Sono in corso studi per mettere a punto la metodica più sensibile per la ricerca di HBV, anche sotto forma di cccDNA, nel fegato trapiantato, al fine di stimare realmente il rischio di ricorrenza di infezione e la conseguente necessità di proseguire a vita la profilassi con HBIg, nonché per verificare la validità della ricerca dell'isoforma cccDNA con marcatore surrogato di persistenza virale con la più elevata specificità.

#### **1.4 Strategie di prevenzione della ricorrenza di infezione e malattia da HBV**

Si calcola che in Europa, la malattia HBV correlata rappresenta oggi il 10% delle indicazioni al trapianto di fegato e tale percentuale si è mantenuta stabile negli ultimi 10 anni [116]. Per tale motivo, le strategie di prevenzione della ricorrenza di infezione da HBV rimangono attuali e risultano avere un impatto economico sempre molto significativo nell'ambito delle risorse disponibili per il trapianto di fegato in questo contesto e per il successivo follow-up [69].

La strategia di prevenzione che si è dimostrata in grado di migliorare radicalmente la prognosi dei trapianti di fegato per malattia HBV correlata è rappresentata dall'uso a lungo termine delle HBIg. Lo studio che rimane di riferimento in questo contesto è quello multicentrico condotto in Europa e pubblicato nel 1993 da Samuel e coll. [57], da cui emerse che il rischio attuariale di recidiva di infezione da HBV era molto più alto nei pazienti sottoposti a trapianto in assenza di immunoprofilassi (75%) rispetto a quello dei pazienti trattati con HBIg a breve (67%) e a lungo termine (33%). Il rischio era comunque significativamente più basso per i soggetti trapiantati per malattia HBV ed HDV correlata (40% per le forme fulminanti e 32% per le cirrosi) e per epatite B fulminate (17%), rispetto alla cirrosi globalmente considerata (67%) [57]. La percentuale di ricorrenza dell'infezione risultava fortemente correlata al livello di replicazione virale al momento del trapianto (livelli di HBV-DNA misurati in ibridizzazione) ed allo status di HBeAg positività [57]. Questi risultati sono stati confermati da altri studi clinici condotti in Europa e negli Stati Uniti, anche con follow-up più a lungo termine [118-124].

Il meccanismo esatto attraverso il quale le HBIg svolgono il loro ruolo protettivo non è noto; si ipotizza che le HBIg circolanti possano legare il virus nel sangue e prevenire il suo legame ai recettori dell'epatocita. In vitro si è dimostrato che, le IgG anti-HBs possano entrare negli epatociti e legare l'HBsAg prevenendo la fuoriuscita dell'HBsAg e dei virioni di HBV dalla cellula epatica [116]. Non esistono prove di un ruolo immunomodulante anti-virale diretto esercitato dalle HBIg stesse e verosimilmente anche dagli eventuali immunocomplessi antigene-anticorpo S che potrebbero formarsi in presenza di virus circolante.

Fin dai primi anni 90 si era notato che, anche per i pazienti HBV-DNA positivi al momento del trapianto, il tasso di recidiva di infezione da HBV poteva essere ridotto ulteriormente utilizzando dosaggi più elevati di HBIg per mantenere un titolo anticorpale sierico di anti-HBs stabilmente superiore a 500 IU/L [57]. Successivamente diversi studi hanno utilizzato alte dosi di HBIg per mantenere un titolo superiore 500 IU/L confermando questi ottimi risultati [118-126].

Oggi sappiamo che nei pazienti trapiantati con livelli viremici superiori a  $10^5$  copie/ml, è sicuramente richiesta una dose di HBIg superiore, tale da mantenere il titolo anticorpale sierico di anti-HBs stabilmente al di sopra di 300 IU/L nel primo anno dal trapianto [127].

Successivamente si è visto che, solo utilizzando una terapia antivirale con analoghi nucleos(t)idici sia nel pre- che nel post-trapianto ed effettuando quindi il trapianto in condizione di HBV-DNA negatività o inferiore a  $10^5$  copie/ml, si può ottenere il massimo dell'effetto protettivo dall'immunoprofilassi passiva con HBIg [65,77]. Infatti la ricorrenza di infezione si verifica dallo 0 al 15% e dal 16 al 35% dei pazienti trapiantati per malattia non replicante e replicante rispettivamente, pur con l'utilizzo delle stesse schedule di somministrazione delle HBIg [124-128]. Dunque, oltre all'uso delle HBIg a partire dalla fase anepatica dell'intervento e successivamente nel post-trapianto, come strategia di prevenzione rimane importante eseguire il trapianto con uno status di infezione da HBV non attiva (HBV-DNA negativo), tanto che già dalla seconda metà degli anni 90, la presenza di replicazione virale attiva è stata considerata una controindicazione al trapianto nella maggior parte dei centri in tutto il mondo [129,130].

Pertanto oggi possiamo affermare che l'utilizzo sistematico delle HBIg ha ridotto molto il rischio di recidiva d'infezione post-trapianto, tanto da rendere possibile il trapianto di fegato per malattia HBV correlata, portando la sopravvivenza a livelli anche superiori a quelli dei trapianti per le altre indicazioni, virale e non [131].

La percentuale di recidiva di infezione era del 90% prima dell'introduzione della profilassi con HBIg ed è scesa al 25% con le HBIg in monoterapia, ma solo con l'utilizzo della Lamivudina in associazione alle HBIg si è arrivati ad ottenere una percentuale di recidiva inferiore al 10% [132-140]. Inoltre, l'associazione con la Lamivudina può ridurre la necessità di alte dosi di HBIg dopo

il trapianto rendendo questa strategia di prevenzione più vantaggiosa, anche dal punto di vista del rapporto costo-beneficio [133].

La somministrazione della Lamivudina ai pazienti con cirrosi scompensata e carica virale superiore a  $10^5$  copie/ml immediatamente prima o durante il periodo di attesa in lista di trapianto, ha permesso di avviare al trapianto il 60-90% dei pazienti con una adeguata soppressione virale e di ottenere una sopravvivenza post-trapianto nettamente superiore [141]. La riduzione dei livelli di replicazione virale al di sotto di  $10^5$  o meglio  $10^3$  copie/ml, rappresenta da solo un fattore indipendente di alta significatività in grado di ridurre drasticamente il rischio di recidiva di infezione post-trapianto [57,65,77,142]. Tuttavia, la somministrazione della Lamivudina prima del trapianto non è efficace nel 20-25% dei pazienti, nei quali la sopravvivenza a breve termine è molto bassa [116]. La causa viene riconosciuta in quasi tutti i casi nello sviluppo di farmaco-resistenza e quindi mutanti virali YMDD (circa il 20% nel primo anno di trattamento). Pertanto i pazienti in lista devono essere monitorati in modo particolarmente stretto per l'HBV-DNA, in modo da poter aggiungere un altro analogo nucleos(t)idico come Adefovir, prima che si raggiungano livelli troppo elevati di viremia. Infatti l'Adefovir è l'unico antivirale analogo nucleosidico, disponibili attualmente, che non presenta cross-resistenza con le mutazioni che inducono resistenza alla Lamivudina. Si attendono i risultati di studi in corso per testare la validità della terapia di combinazione (Lamivudina ed Adefovir) come terapia di prima linea nel pre-trapianto in questo gruppo di pazienti [116].

La Lamivudina in monoterapia è stata testata dopo il trapianto come strategia di prevenzione ed i risultati a medio e lungo termine, complessivamente, non sono stati soddisfacenti. La percentuale di recidiva di infezione da HBV sottoforma di positività dell'HBsAg e di HBV-DNA raggiunge il 40% fra il 3° ed il 4° anno dal trapianto, e tale percentuale è proporzionale al follow-up dal trapianto stesso [143]. Infatti, ad un anno la percentuale di ricorrenza è del 10% [144], ma a più lungo termine la quota di ricorrenza può raggiungere anche il 50%, con recidiva di infezione resistente alla Lamivudina a causa dello sviluppo di mutanti YMDD farmaco-resistenti a carico della trascrittasi inversa virale [144-146]. La maggiore incidenza di farmaco-resistenza alla



Lamivudina nel post-trapianto è stata osservata soprattutto in pazienti con alti livelli di replicazione virale prima del trapianto stesso [147]. Questi pazienti sviluppano ricorrenza di HBV con resistenza alla Lamivudina e presentano un outcome severo nella maggior parte dei casi, se non trattati precocemente con terapia antivirale “rescue” [148]. Studi randomizzati in pazienti trapiantati per malattia HBV correlata a basso rischio di ricorrenza di infezione (assenza di HBV-DNA al momento del trapianto e nessuna recidiva di infezione a 6 mesi dal trapianto), a ricevere HBIg o Lamivudina dopo un periodo di somministrazione di sole HBIg, hanno dimostrato che ad un anno la recidiva di infezione non è significativamente differente nei due gruppi. Tuttavia, nel follow-up a medio termine, considerando complessivamente i pazienti con e senza recidiva di infezione, l’HBV-DNA è quantificabile in PCR fino al 50% dei pazienti mantenuti con Lamivudina in monoterapia (vs. 18% con le HBIg) [149,150]. Considerando che il rischio di recidiva da HBV mutato e resistente alla Lamivudina è tempo dipendente, un follow-up di un anno è troppo limitato per la stima delle percentuali di ricorrenza di infezione nei pazienti mantenuti in profilassi con la sola Lamivudina.

Così l’utilizzo della Lamivudina in monoterapia come profilassi dopo il trapianto è probabilmente insufficiente, soprattutto a partire dal secondo anno dopo l’intervento e nei pazienti non trattati precedentemente con analoghi nucleos(t)idici e con replicazione attiva al momento dell’intervento [116].

I pazienti coinfecti con HDV sono meno a rischio di ricomparsa dell’HBsAg, rispetto ai pazienti con la sola infezione B [57]. La quota di ricomparsa dell’HBsAg in pazienti con cirrosi da virus B e delta era di circa il 50-60% in pazienti che non ricevevano HBIg a lungo termine [71,151] e del 17% di quelli che ricevevano HBIg a lungo termine [97]. La quota complessivamente più bassa di recidiva di HBV in questi pazienti coinfecti prima del trapianto, è probabilmente secondaria al fatto che nella maggior parte dei casi l’HBV-DNA si presenta negativo al momento del trapianto, si pensa per l’effetto inibitorio che HDV esercita sulla replicazione di HBV [151].

Per prevenire l’infezione “de novo” da HBV due approcci complementari sono stati proposti: 1. la vaccinazione anti-HBV, magari con schedule rinforzate prima del trapianto di fegato di tutti i

pazienti in lista di trapianto, anche se i risultati in termini di risposta anticorpale “protettiva” sono scarsi (fino al 40% in alcune casistiche) [152]. 2. la determinazione degli anti-HBc nel donatore e l’utilizzo di organi positivi solo in pazienti riceventi HBV positivi per pregressa infezione. Poiché il rischio di trasmissione dell’infezione è basso se il ricevente è anti-HBs e anti-HBc positivo, la selezione di riceventi anti-HBs positivi è sufficiente senza altri interventi. Ci può essere una differenza nel rischio di acquisizione di HBV per i riceventi che sono anti-HBc positivi senza la positività concomitante dell’HBsAb. I fegati di donatori HBcAb positivi possono essere donati a riceventi anti-HBc positivi “isolati”, purché vengano adottate misure di profilassi idonee. Mentre devono essere utilizzate sicuramente HBIg e/o Lamivudina in pazienti naive riceventi organi da donatori anti-HBc positivi, considerati marginali in questa popolazione, ma che sono utili in condizioni di malattia critica che necessita di trapianto urgente o epatocarcinoma.

Secondo le linee guida attuali [116], i pazienti che sono considerati candidabili a trapianto di fegato per malattia HBV correlata, dovrebbero essere divisi in coloro che presentano o non, replicazione virale attiva. Per i pazienti senza replicazione virale attiva, non c’è evidenza che un antivirale prima del trapianto sia vantaggioso. Tutti dovrebbero ricevere alte dosi di HBIg (di solito 10000 IU) ogni giorno per i primi 5 o 7 giorni dopo l’intervento, a partire dalla fase anepatica e poi indefinitamente ogni 6-8 settimane per mantenere un titolo di anti-HBs superiore a 300 IU/L nei primi 6 mesi e 100 IU/L successivamente. Per i pazienti con attiva replicazione virale la terapia con Lamivudina dovrebbe essere iniziata prima del trapianto. I pazienti che hanno sviluppato resistenza alla Lamivudina possono essere trattati efficacemente con Adefovir fino ad ottenere un’adeguata soppressione virale. Il trapianto può essere fatto solo se l’HBV-DNA è negativo o inferiore a  $10^5$  copie/ml (in PCR) ed i pazienti a più alto rischio di ricorrenza dovrebbero ricevere sempre la combinazione di Lamivudina e HBIg per mantenere un titolo di anti-HBs superiore a 500 IU/L nel primo anno e a 100 UI/L successivamente.

Prospettive future, specialmente nei pazienti senza replicazione virale attiva prima del trapianto, sono proiettate verso la possibilità di sospendere le HBIg e sostituirle con la Lamivudina in

monoterapia o con la vaccinazione anti-HBV. L'obiettivo principale che guida tali evoluzioni rimane sempre la riduzione a lungo termine dei costi, attraverso soprattutto la riduzione della somministrazione delle HBIg, pur mantenendo un adeguato livello di protezione per quello che è il rischio di ricorrenza stimabile durante il follow-up dal trapianto, nonché migliorare la qualità di vita del paziente che in alternativa non sarebbe più dipendente a vita dalla terapia via parenterale con HBIg. Infatti, i problemi secondari all'utilizzo a lungo termine delle HBIg sono i seguenti:

1. costi estremamente elevati (che raggiungono e superano quelli del trapianto stesso al terzo anno circa dall'intervento [69])
2. durata a vita della profilassi (che impegna il sistema sanitario ed il paziente ad attendere accessi ospedalieri ogni 1-2 mesi)
3. la sempre possibile persistenza di HBV nel siero, nel fegato o nelle cellule mononucleate nel sangue periferico (fino al 50% dei pazienti trapiantati per malattia HBV che sono HBsAg negativi sotto la profilassi con HBIg, anche oltre i 10 anni post-trapianto [117]) e quindi la recidiva di infezione con virus mutato e resistente alle HBIg e/o alla Lamivudina

Il primo passo verso la riduzione significativa dei costi di profilassi è stata proprio l'associazione con la Lamivudina, che ha permesso di abbassare significativamente il livello di anti-HBs sierico ottenibile con le HBIg e considerato protettivo [116]. Inoltre, dove è possibile per la scarsa disponibilità nella maggior parte dei centri trapianto, la sostituzione delle HBIg per uso endovenoso con quelle somministrabili per via intramuscolare, può ridurre il consumo immunoglobulinico per paziente [116]. Protocolli con l'utilizzo di basse dosi con HBIg per via intramuscolare hanno riportato un'efficacia superiore al 90% nei primi 2 anni di follow-up [153]. Una significativa riduzione dei costi per l'immunoprofilassi si può ottenere con la somministrazione delle HBIg "on demand", cioè quando il titolo anticorpale scende al di sotto del livello protettivo; dopo il primo anno, in pazienti a basso rischio di ricorrenza di infezione, il livello protettivo può essere considerato 100 IU/L. Infatti, stabilito che il consumo

immunoglobulinico è strettamente paziente-dipendente, cioè variabile tra i diversi pazienti (variabilità interindividuale), e che esiste una variabilità anche nello stesso paziente in tempi differenti (variabilità intraindividuale), si possono dilazionare molto le somministrazioni con l'approccio "on demand", purché si effettuino controlli molti ravvicinati del titolo di anti-HBs. Tale strategia si è dimostrata in grado di dimezzare i costi, pur mantenendo una adeguata immunoprofilassi passiva [69].

La sospensione delle HBIg in particolari categorie di pazienti con lungo follow-up dal trapianto (dopo almeno 36 mesi in pazienti con HBV-DNA < 10<sup>5</sup> copie/ml prima del trapianto) può essere considerata con sicurezza. La vaccinazione anti-HBV, dove efficace ed in grado di indurre la produzione di un titolo elevato e duraturo di anti-HBs, potrebbe rappresentare la soluzione a tutti i problemi legati all'uso continuativo delle HBIg sopra elencati (cfr. paragrafo successivo). Ed infine, di estremo interesse appare la cosiddetta profilassi "à la carte"; una profilassi basata sul rischio reale stimato di recidiva di infezione [116]. Tale rischio potrà essere stimato con affidabile precisione solo quando saranno disponibili su larga scala le moderne metodiche PCR per la ricerca del cccDNA e delle altre isoforme di persistenza di HBV nel fegato e nel sangue.

Al momento la raccomandazione universale rimane la profilassi a vita; dopo un periodo di almeno 12 mesi dal trapianto durante il quale è stata effettuata la corretta profilassi di combinazione (HBIg ed analogo nucleos(t)idico) si può considerare la scelta di una delle seguenti opzioni [116]:

1. HBIg ev. + Lamivudina/Adefovir
2. HBIg im + Lamivudina/Adefovir
3. HBIg + Lamivudina a cui segue la vaccinazione anti-HBV
4. Analogo nucleos(t)idico in monoprofilassi
5. Combinazione di 2 analoghi nucleos(t)idici senza HBIg

Non sono disponibili studi di combinazione con altri analoghi nucleos(t)idici (Adefovir o Entecavir) dal trapianto, ma i risultati che si possono attendere sono almeno paragonabili a quelli con la Lamivudina.

***Vaccinazione anti-HBV come strategia di prevenzione della ricorrenza di infezione da HBV post-trapianto di fegato per malattia HBV correlata***

Il vaccino ricombinante anti-HBV di tipo S, nei soggetti sani e naïve per l'HBV ed utilizzato con una schedula standard di 3 dosi da 20 µg (0, 1 e 6 mesi) somministrate per via intramuscolare, ha un elevato profilo di sicurezza ed è altamente immunogenico, conferendo una protezione a lungo termine in più del 95% dei casi [154]. Nel soggetto immunocompetente si considera protettivo un titolo anticorpale anti-HBs superiore a 10 IU/L, anche se la memoria immunologica verso l'antigene S sembrerebbe avere un effetto continuo, mantenendo sempre la capacità di risposta nei confronti di stimoli provenienti da dosi vaccinali di richiamo o dal contatto con HBV, anche in assenza di anticorpi anti-HBs circolanti [155]. Sono stati descritti rari casi di neuropatia di tipo demielinizzante verificatasi in concomitanza con la vaccinazione anti-HBV; tuttavia, non esistono dati di correlazione che fanno indicare la presenza di un aumentato rischio di tali disordini neurologici nei soggetti sani che si sottopongono alla vaccinazione anti-HBV [156].

La disponibilità di un vaccino anti-HBV in grado di stimolare la produzione di un titolo elevato di anticorpi anti-HBs definibili "naturali", in linea teorica, permetterebbe di abbattere i costi della immunoprofilassi passiva con HBIg nel post-trapianto e di risolvere radicalmente gli aspetti negativi che caratterizzano la somministrazione a lungo termine delle HBIg umane.

Ad oggi disponiamo di alcuni dati di efficacia del vaccino standard di tipo S nel paziente sottoposto a trapianto di fegato per malattia HBV correlata; si tratta di studi di piccole dimensioni e sempre con follow-up post-vaccinale molto limitato. Ciononostante, la sintesi porta a concludere che la vaccinazione standard con vaccino ricombinante S e adiuvante alluminio, è molto poco efficace nello stimolare la produzione di anticorpi anti-HBs nel paziente immunocompromesso, categoria che comprende anche i pazienti sottoposti a trapianto di fegato [157,158] o rene [159], pazienti in trattamento emodialitico cronico [160] e coloro che sono affetti da epatite cronica C [161] o cirrosi epatica [158,162,163]. Le terapie immunosoppressive come quelle a base di steroidi o inibitori delle calcineurine, interferiscono negativamente sulla risposta immune nei confronti della maggior parte dei stimoli vaccinali, inibendo la produzione

di un'immunità di risposta in diversi punti del processo di attivazione dell'immunità stessa [157]. Anche per tale motivo, e verosimilmente per fattori dipendenti dal paziente non noti (es. una storia di infezione cronica decennale con HBV che ha esitato in cirrosi o un assetto genetico che conferisce immuno-deficit, ecc.) il soggetto trapiantato di fegato per eziologia non virus B correlata presenta delle risposte alla vaccinazione anti-HBV inferiori al 25% ed il titolo anticorpale sviluppato si riduce rapidamente, nonostante l'utilizzo di schedule vaccinali rinforzate [157,158].

La vaccinazione con vaccino standard di tipo S è stata testata anche nel paziente trapiantato per malattia HBV correlata [164,165] e nei pazienti affetti da epatite cronica B prima dello sviluppo della cirrosi [166], ma, anche in questo contesto, si è dimostrata complessivamente poco efficace o del tutto inefficace nei due gruppi rispettivamente.

La maggior parte degli studi ha utilizzato il vaccino ricombinante standard secondo un approccio più aggressivo, cioè con una schedula vaccinale rinforzata (dosaggio doppio) ed accelerata (dosi mensili) [164,165].

Questo approccio nell'ambito della vaccinazione del paziente trapiantato di fegato, è stato suggerito da studi che hanno indicato la superiorità di tale strategia vaccinale rispetto a quella standard somministrata nel soggetto immunocompetente [167]. Ciononostante, la vaccinazione rinforzata anti-HBV nel paziente sottoposto a trapianto per malattia HBV correlata ha dato risultati contraddittori e complessivamente negativi [164,165]. L'interpretazione dei risultati è stata resa difficile anche dalla differente definizione di titolo anticorpale anti-HBs "protettivo", considerata nei diversi studi [168,169]. Infatti, gli autori spagnoli (Sanchez-Fueyo et al.), che per primi testarono il vaccino anti-HBV standard nel paziente trapiantato per malattia HBV correlata, hanno considerato protettivo un titolo anticorpale di 10 UI/L [165]. Diversamente lo studio italiano (Angelico et al.), immediatamente successivo, simile per molti aspetti metodologici, aveva considerato risposte efficaci, quelle per titoli anticorpali superiori a 100 UI/L, come viene riconosciuto internazionalmente per il paziente trapiantato di fegato e sottoposto a terapia immunosoppressiva ed immunoprofilassi con HBIG [164].

Sanchez-Fueyo et al. hanno riportato risultati incoraggianti sull'efficacia della vaccinazione dopo trapianto di fegato per malattia HBV [165]. 14 (82%) di 17 pazienti hanno sviluppato un titolo di anti-HBs superiore a 10 IU/L dopo 1 o 2 cicli di vaccinazione con vaccino ricombinante S somministrato al dosaggio di 40 µg (Engerix®) in 2 cicli da 2 dosi mensili ed una terza dopo 6 mesi ciascuno, somministrate per via intramuscolare; la maggior parte dei responders ha riportato una risposta anticorpale superiore a 10 UI/L dopo il 2° ciclo di vaccinazione, pur con titoli complessivamente non elevati. Lo studio spagnolo, che prevedeva la sospensione della Lamivudina in tutti i pazienti, non ha documentato casi di recidiva di infezione e durante la fase iniziale della vaccinazione sono state mantenute le HBIg a dosaggi medi.

Questi risultati non sono stati confermati dallo studio italiano successivo [164]. Infatti solo 2 (11,8%) pazienti su 17 hanno riportato una buona risposta anticorpale con titoli di molto superiori a 100 UI/L, ma tutti gli altri presentavano una risposta nulla (titoli inferiori a 10 IU/L). Lo studio italiano differisce da quello spagnolo per la sospensione delle HBIg prima della vaccinazione (fino al raggiungimento del completo wash-out delle HBIg circolanti), per il mantenimento della Lamivudina durante tutta la vaccinazione e per l'applicazione di una sequenza di 3 cicli di vaccinazione. Il primo ed il terzo ciclo con 3 dosi da 40 µg (Recombivax®) somministrati mensilmente per via intramuscolare (come nello studio spagnolo), mentre il secondo ciclo con 6 dosi da 10 µg (Recombivax®) somministrate per via intradermica.

Utilizzando la definizione di 10 UI/L come titolo anticorpale protettivo, la risposta complessiva nello studio italiano sale a 17.6% (82.3% vs. 17.6%,  $P=0.0002$ ), mentre quella nello studio spagnolo scende a 23.5 (23.5 vs. 11.7%,  $P=0.32$ ).

Il follow-up dei 2 pazienti responders dello studio italiano è stato riportato nei successivi 4 anni, durante i quali i pazienti non hanno ripreso le HBIg e non hanno assunto la Lamivudina [170]. Infatti, in un paziente il titolo (sviluppato dopo il primo ciclo di vaccinazione (687 IU/L)) si è mantenuto per i successivi 27 mesi ad un titolo elevato, per decrescere successivamente sotto a 100 IU/L. Una dose di richiamo ha permesso di raggiungere un titolo di anti-HBs di 25000 IU/L.

Mentre l'altro paziente risponder (solo dopo il 3° ciclo di vaccinazione), ha avuto la necessità di altre 5 somministrazioni di dosi di richiamo (dopo 20, 32, 36, 44 e 50 mesi, rispettivamente), a cui è seguita sempre una risposta anticorpale molto significativa.

Questi, come tutti i casi descritti con sviluppo di titoli anticorpali di anti-HBs elevati, dimostrano come la vaccinazione nel paziente trapiantato per malattia HBV correlata è possibile e può essere utilizzata come unica strategia di prevenzione, ma solo in singoli pazienti che differiscono dalla maggioranza per fattori ancora oggi non identificabili.

Il confronto fra questi 2 studi [171,172], pur paragonabili per i livelli di immunosoppressione esercitati e per il tipo di vaccino (ricombinante S), ha posto una serie di interrogativi che ad oggi rimangono insoluti:

- numero di dosi necessarie (300 ug nello studio italiano e 240 ug nello studio spagnolo)
- tempo complessivo di vaccinazione
- ruolo immunomodulante della Lamivudina
- ruolo delle HBIg (somministrate durante la vaccinazione) attraverso la formazione dell'immunocomplesso con l'HBsAg vaccinale
- tipologia della malattia HBV pre-trapianto (6 pazienti dello studio spagnolo erano stati trapiantati per malattia fulminante, mentre nello studio italiano tutti erano stati trapiantati per cirrosi)
- follow-up dal trapianto (48 mesi nello studio italiano e 30 mesi nello studio spagnolo)

La Lamivudina si è dimostrata in grado di “restaurare” quella iporesponsività immunologica specifica (linfociti T citotossici) che caratterizza i pazienti con infezione cronica da HBV [37].

Sulla base di queste evidenze, lo studio italiano aveva mantenuto la Lamivudina, anche se di fatto si trattava di pazienti non più viremici dal trapianto. Inoltre, la protezione esercitata dalla Lamivudina rese possibile la sospensione delle HBIg, per effettuare il wash-out anticorpale sierico come previsto dal protocollo. Infatti, inizialmente si pensava che il legame tra vaccino ed immunoglobulina anti-HBs potesse esercitare un effetto negativo sull'efficacia vaccinale, attraverso un effetto neutralizzante delle HBIg stesse sul vaccino. Tuttavia, è stato



successivamente dimostrato sia nell'animale che nell'uomo, che la formazione dell'immunocomplesso HBsAg (vaccino)/HBsAb (HBIg) è in grado di aumentare in modo significativo l'immunogenicità dell'antigene vaccinale stesso [173-176]. Per tale motivo, alcuni dei pazienti non responder dello studio italiano sono stati vaccinati nuovamente con 2 cicli rinforzati da 3 dosi ciascuno somministrate mensilmente, ma stavolta senza togliere le HBIg e sospendendo la Lamivudina, ma nessuno caso di risposta anticorpale significativa è stato riportato [177].

Albeniz et al. [178] hanno vaccinato 12 pazienti trapiantati per malattia HBV correlata con un follow-up di almeno 24 mesi. Il protocollo prevedeva 3 dosi mensili da 40 µg del vaccino ricombinante S standard, somministrate a distanza di 2 mesi dall'ultima dose di HBIg. Il 75% dei pazienti ha sviluppato un titolo anticorpale superiore a 10 UI/L. Tuttavia, analizzando i dati secondo la definizione di titolo di anti-HBs protettivo al di sopra di 100 IU/L, la percentuale di pazienti responder scende al 23%.

La stessa schedula vaccinale è stata applicata a 52 pazienti trapiantati per cirrosi HBV correlata da Lo CM et al. [179]. La casistica comprendeva pazienti che non avevano mai ricevuto le HBIg ed erano stati mantenuti con la sola Lamivudina. Al momento del trapianto, tutti erano positivi per HBsAg e 10 di questi erano positivi per l'HBV-DNA. 36 pazienti avevano ricevuto un fegato da donatore vivente e 19 di questi avevano sviluppato una produzione spontanea, ma solo temporanea (nei primi 3 mesi) di anticorpi anti-HBs. Questa evidenza è stata attribuita ad un fenomeno detto di "adoptive immunity transfer" o al trasferimento di immunità, soprattutto quella cellulare (linfociti intraepatici) del donatore [180]. Solamente 4 pazienti (7.7%) hanno sviluppato una produzione di anti-HBs superiore a 10 IU/L dopo la seconda dose di vaccino ed al 3° mese di follow-up, nessuno dei responders ha mantenuto la risposta anticorpale. Un paziente ha sviluppato una recidiva di infezione resistente alla Lamivudina.

Mancano dati sull'utilizzo del vaccino contenente le proteine pre-S nel paziente trapiantato di fegato per malattia HBV correlata; nel soggetto immunocompetente un vaccino contenente pre-S1/S2 e S si è dimostrato più immunogenico dello standard [181-183]. In un unico studio

pubblicato, il vaccino contenente pre-S1, pre-S2 e S è stato somministrato a 14 pazienti trapiantati 12-50 mesi prima per cirrosi HBV correlata [184]. Dopo una schedula a doppio dosaggio e 2 cicli da 3 dosi ciascuno, nessun paziente ha sviluppato una risposta anticorpale spontanea.

Non è mai stata testata l'immunogenicità del vaccino anti-HBV contenente DNA di HBV che codifica HBsAg; nei volontari sani si è dimostrato molto efficace nello stimolare sia l'immunità umorale che cellulo-mediata specifiche [185,186].

Recentemente, Bienzle et al. [187] hanno utilizzato il vaccino ricombinante S coniugato con 2 nuove molecole adiuvanti (non più l'alluminio), riportando una risposta anticorpale ampiamente significativa (>100 IU/L) in più dell'80% dei pazienti trapiantati per cirrosi HBV correlata. La somministrazione delle HBIg è stata mantenuta per un lungo periodo durante la vaccinazione, o comunque finché il titolo anticorpale non avesse superato 500 IU/L. In questo studio tedesco, sono stati vaccinati 2 gruppi di 10 pazienti ciascuno con differenti concentrazioni dei 2 nuovi adiuvanti (3-deacylated monophosphoryl lipid A (MPL) e Quillaja saponaria (QS21)) a 0, 2, 4, 16 e 18 settimane. Il protocollo prevedeva 3 dosi aggiuntive ad intervalli bimestrali per coloro che non avessero raggiunto un titolo di anti-HBs superiore a 500 IU/L. 16 (8 in ciascun gruppo) di 20 pazienti (80%) hanno risposto alla vaccinazione ed hanno potuto sospendere le HBIg, sviluppando i seguenti titoli anticorpali medi: 7293 [range: 721-45.811] IU/L (gruppo 1) e 44549 [range: 900-83121] UI/L (gruppo 2). Il follow-up successivo è stato di 13.5 (6-22) mesi. Il vaccino utilizzato si è caratterizzato anche per un profilo di tollerabilità elevato (paragonabile a quello del vaccino standard) ed i pazienti che hanno mantenuto la Lamivudina od il Famciclovir durante la vaccinazione, hanno mostrato delle risposte significativamente più elevate. Dopo un follow-up medio di 24 mesi, 11 dei 16 responders avevano un titolo anticorpale inferiore a 100 IU/L; dopo un'unica dose, doppia da 40 µg, di vaccino ricombinante S standard, tutti i pazienti hanno recuperato una risposta efficace con un titolo di anti-HBs di molto superiore a 100 IU/L [188]. Il follow-up successivo è breve e si attendono i risultati a lungo termine.

Questi risultati positivi, diametralmente opposti a quella che era stata la tendenza precedente, attendono ancora di essere confermati su di una casistica più ampia e con un follow-up post-vaccinale più lungo. Questa evidenza positiva è stata in parte confermata da uno piccolo studio successivo [189], su di una casistica di 10 pazienti trapiantati per malattia HBV correlata e con un lungo follow-up dal trapianto. Continuando la somministrazione delle HBIg quando il titolo anticorpale scendeva sotto a 150 IU/L e senza la Lamivudina, Strakel et al. hanno riportato una risposta del 40% (4/10 pazienti), utilizzando il vaccino S unito all'adiuvante MPL; in 3 pazienti i titoli di anti-HBs erano di molto superiori a 1000 IU/L, mentre in un paziente aveva sviluppato un titolo anticorpale di 706 IU/L [189].

Sulla base di questi risultati, ad oggi si può affermare che il 20% circa dei pazienti trapiantati per malattia HBV correlata possono essere immunizzati efficacemente con il vaccino ricombinante S, in modo da poter interrompere l'immunoprofilassi passiva con HBIg in modo sicuro. Inoltre, i pazienti sottoposti a trapianto per epatite fulminante da HBV risponderebbero meglio alla vaccinazione [190] e l'aggiunta di potenti adiuvanti può incrementare la percentuale di risposta al vaccino fino all'80%.

Si può ipotizzare che l'allungamento del tempo di vaccinazione potrebbe aumentare la percentuale di risposta nel gruppo dei pazienti più resistenti [171,190] e che la vaccinazione andrebbe effettuata dopo i primi 6-12 mesi dal trapianto, quando il regime immunosoppressivo raggiunge i livelli minimi ottenibili nei singoli pazienti.

Il futuro della vaccinazione sembra essere rivolto verso l'utilizzo del vaccino ricombinante S unito all'adiuvante MPL, anche se deve ancora essere definita la schedula vaccinale più efficace e dal rapporto costo/beneficio migliore. Questo appare ancora più vero, se si guardano i risultati, assolutamente deludenti, dell'ultimo studio pubblicato con l'utilizzo del vaccino standard adiuvato con l'alluminio [191]. 24 pazienti trapiantati per malattia HBV correlata hanno ricevuto 4 cicli di vaccinazione con dosi doppie (40 µg) e somministrazioni mensili, mantenendo basse dosi di HBIg durante tutta la vaccinazione. Solo 2 pazienti su 24 (8.3%) dopo il 3° ed il 4° ciclo,

rispettivamente, hanno sviluppato un titolo di anti-HBs ampiamente superiore a 1000 IU/L e hanno potuto sospendere l'immunofilassi passiva.

Confronta le tabelle N° 1 e 2 per un confronto sistematico dei principali trials riportati, distinguendo gli studi per numero di pazienti, malattia B pre-trapianto, per l'utilizzo di Lamivudina, di HBIg, tipo di vaccino ed adiuvante, nonché per la risposta anticorpale ottenuta al termine del follow-up.

	<b>Sanchez- Fueyo et al (2000)</b>	<b>Angelico et al (2002)</b>	<b>Albeniz Arbizu et al (2003)</b>	<b>Lo et al (2005)</b>	<b>Rosenau et al (2007)</b>
<b>Pazienti</b>	17	17	12	52	24
<b>HBV acuta/cronica</b>	6/11	0/17	1/11	0/52	5/19
<b>Mesi dal OLT</b>	31 (18-76)	48 (25-85)	>24	14 (12-68)	40 (13-124)
<b>Lamivudina (%)</b>	18	100	67	100	92
<b>HBIg durante la vaccinazione</b>	Si	No	No	No	Si
<b>N° di dosi (per ciclo)</b>	3 + 3	3 + 6 + 3	3 + 3 + 3	3 + 3	3 + 3 + 3
<b>HBsAg dose (ug)</b>	40 + 40	40 + 10 + 40	40 + 40 + 40	40 + 40	40
<b>Anti-HBs &gt;10 IU/L</b>	76,4 (14)	17,6 (3)	75 (9)	7,7 (4)	ND
<b>Anti-HBs &gt; 100 IU/L</b>	23,5 (4)	11,8 (2)	23 (3)	1,9 (1)	8,3 (2)
<b>Anti-HBs &gt; 500 UI/L</b>	11,7 (2)	5,8 (1)	ND	0	8,3 (2)
<b>Anti-HBs responders</b>	47 (10-1000)	253 (20-678)	ND	22 (12-103)	2.502 e 1.302

Tabella N° 1. Trials con l'utilizzo del vaccino anti-HBV adiuvato da alluminio standard.

	<b>Bienze et al (2003)</b>	<b>Starkel et al (2005)</b>	<b>Rosenau et al (2006)</b>
<b>Pazienti</b>	20 (10 + 10)	10	8
<b>HBV acuta/cronica</b>	2/18	2/8	0/8
<b>Mesi dal OLT</b>	78 (24-156)	55 (36-120)	60 (26-90)
<b>Lamivudina (%)</b>	20	0	100
<b>HBIg durante la vaccinazione</b>	Si	Si	No
<b>N° di dosi (per ciclo)</b>	5 + 3	5	6
<b>HBsAg dose (ug)</b>	20 - 100	40	20
<b>Anti-HBs &gt;10 IU/L</b>	80% (16)	40% (4)	12,5% (1)
<b>Anti-HBs &gt; 100 IU/L</b>	80% (16)	40% (4)	12,5% (1)
<b>Anti-HBs &gt; 500 UI/L</b>	80% (16)	40% (4)	12,5% (1)
<b>Anti-HBs responders</b>	25.344 (1.255-83.121)	>1000 (4x>1000)	561

Tabella N° 2. Trials con l'utilizzo del vaccino anti-HBV adiuvato da MPL.

## **2. PROTOCOLLO DI STUDIO**

### **2.1 Disegno e criteri di arruolabilità/esclusione**

L'obiettivo principale che il presente studio si propone è quello di verificare l'efficacia in termini di produzione spontanea di anticorpi anti-HBs del vaccino ricombinante S (Fendrix®, fiale monodose da 0,5 mL per sospensione iniettabile; distribuito da GlaxoSmithKline biological s.a., Belgio; EU/1/04/0299/001), prodotto da cellule di lievito (*Saccharomyces Cerevisiae*) mediante tecnologia del DNA ricombinante, adiuvato da AS04C che contiene 3-O-desacil-4'-monofosoril lipide A (MPL). Il vaccino utilizzato contiene 20 µg di antigene S e 50 µg di adiuvante MPL ed è contenuto in una fiala monodose da 0,5 mL per sospensione iniettabile per via intramuscolare.

I pazienti arruolati non hanno interrotto l'assunzione della Lamivudina (100 mg/die) durante il periodo di vaccinazione e di follow-up. In tre casi, la Lamivudina è stata assunta in combinazione all'Adefovir per pregressa infezione da HBV resistente alla Lamivudina; tutti e 3 i casi hanno effettuato il trapianto con HBV-DNA <math>10^4</math> copie/mL. Nei primi 6 mesi di vaccinazione (6 dosi mensili), i pazienti hanno continuato a ricevere le HBIg al dosaggio di 2000 U, mensilmente, anziché "on demand" quando il titolo anticorpale scendeva a 100 UI/L come era stato nel periodo precedente all'arruolamento nello studio.

La durata complessiva della vaccinazione è stata di 12 mesi e la schedula di vaccinazione ha previsto complessivamente 12 dosi mensili, somministrate per via intramuscolare. Il protocollo di studio si è svolto attraverso 2 fasi di vaccinazione: la fase 1 e la fase 2 (cfr. figura N° 1, a fine paragrafo), della durata di 6 mesi ciascuna, per un totale di 12 dosi di vaccino. La fase 1 ha previsto la somministrazione della dose di vaccino entro 7 giorni dalla somministrazione di 2000 U di HBIg (Hepatect®, fiale da 2000 U) per via endovenosa, secondo la seguente tempistica: 0, 1°, 2°, 3°, 4° e 5° mese. La fase 2 ha previsto la somministrazione della dose di vaccino mensilmente, senza la precedente somministrazione di HBIg (sospensione della durata di 12 mesi: 6 mesi di vaccinazione durante la fase 2 e i 6 mesi di follow-up successivi all'ultima dose

di vaccino), secondo la seguente tempistica: 6°, 7°, 8°, 9°, 10°, e 11° mese. Dunque, sia nella prima che nella seconda fase sono state somministrate 6 dosi di vaccino, per un dosaggio di HBsAg per fase pari a 120 µg e 240 µg complessivamente.

I pazienti arruolabili sono coloro che avevano ricevuto un trapianto di fegato per malattia HBV correlata da almeno 12 mesi e durante il primo anno di follow-up erano risultati, ad ogni controllo, HBsAg e/o HBV-DNA negativi. Sono stati considerati arruolabili coloro che al momento del trapianto risultavano HBsAg positivi e HBV-DNA < 10<sup>5</sup> copie/mL, compresi i pazienti coinfecti con HCV e/o HDV, indipendentemente dalla terapia antivirale con analoghi nucleos(t)idici HBV specifici. Sono stati considerati arruolabili anche coloro che prima del trapianto hanno sviluppato resistenza alla Lamivudina e per tale motivo erano in trattamento con la combinazione di Lamivudina ed Adefovir, purché avessero l'HBV-DNA < 10<sup>5</sup> copie/mL al momento del trapianto.

I criteri fondamentali di esclusione dal protocollo sono stati i seguenti:

- recidiva di infezione da HBV post-trapianto (HBsAg positività in assenza di terapia con HBIg con o senza HBV-DNA positività)
- positività su tessuto epatico per l'HBsAg e/o HBcAg ricercati mediante immunocistochimica
- positività su tessuto epatico per cccDNA o sue isoforme ricercati mediante PCR nested
- evidenza di sierconversione spontanea ed a titolo anticorpale protettivo post-trapianto in assenza di terapia con HBIg (HBsAg negativo e HBsAb >100 UI/L)
- rigetto acuto o cronico documentato da istologia
- complicanze vascolari e biliari maggiori in fase attiva

L'obiettivo principale dello studio è stato quello identificabile nel raggiungimento di una produzione spontanea di anticorpi anti-HBs ad un titolo protettivo superiore a 100 IU/L e persistente durante il follow-up.

Gli obiettivi secondari sono stati individuati nell'identificazione dei fattori paziente- o trapianto-dipendenti, che potessero influenzare la risposta alla vaccinazione anti-HBV. Questi ultimi comprendono l'eventuale ruolo delle HBIg e la presenza di coinfezioni con HCV e/o HDV in stato di attività prima e/o dopo il trapianto stesso, nell'aumentare e nel ridurre l'immunogenicità del vaccino rispettivamente. Obiettivo secondario è stato anche la stima del rapporto costo/beneficio in termini di protezione contro la ricorrenza di infezione da HBV post-trapianto di fegato in proporzione alle risorse economiche impiegate vs. la profilassi standard con HBIg a dosi fisse "ad vitam" e Lamivudina.

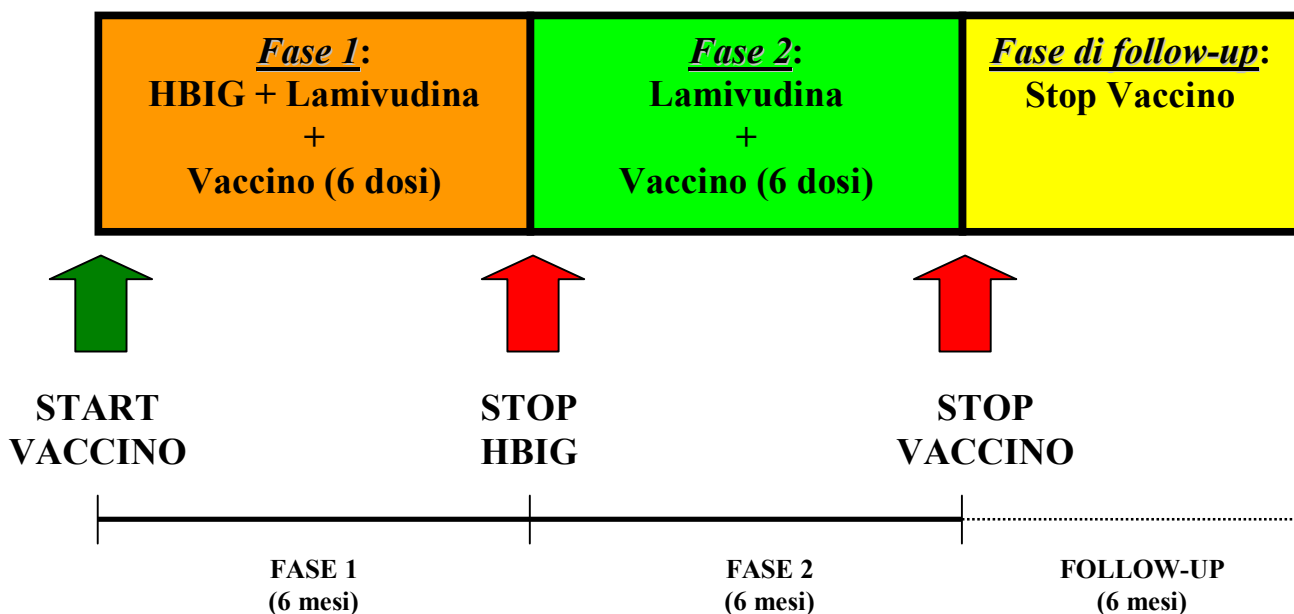


Figura N° 1. Schema del protocollo secondo le fasi di svolgimento 1, 2 e follow-up

## 2.2 Metodologia

I pazienti che presentavano i criteri per l'arruolamento (cfr. paragrafo 2.1) e che non possedevano alcun criterio di esclusione hanno effettuato i seguenti esami di screening:

1. biopsia epatica per la ricerca del cccDNA su tessuto epatico e per la ricerca degli antigeni S e C con metodica di immunistochimica
2. analisi biochimiche generali e di funzione epatica e renale
3. markers sierici di HBV, HCV e HDV
4. HBV-DNA con metodica PCR (metodica Taqman, Roche e sensibilità di 69 copie/mL)

Tali analisi, ove si eccettui la biopsia epatica, sono state ripetute al 3°, 6°, 12° e 18° (fine follow-up) mese in tutti i pazienti vaccinati. Sono stati misurati i livelli di anti-HBs (UI/L) mensilmente metodica immunoenzimatica (AUSAB EIA, Abbot). Nella fase 1 dello studio, il titolo anti-HBs è stato misurato prima di ogni somministrazione di HBIg, nella fase 2 prima di ogni somministrazione di vaccino e nel follow-up mensilmente.

La definizione di “*responder*” alla vaccinazione è stata considerata differentemente nelle due fasi dello studio come segue:

- fase 1: aumento del titolo anti-HBs superiore a 100 UI/L rispetto alla controllo precedente effettuato prima della somministrazione delle HBIg
- fase 2: raggiungimento e mantenimento di un titolo di anti-HBs superiore a 100 UI/L per almeno 60 giorni durante la vaccinazione
- follow-up: raggiungimento e mantenimento di un titolo di anti-HBs superiore a 100 UI/L per almeno 6 mesi dopo l'ultima dose di vaccino

Ha rappresentato un criterio di sospensione della somministrazione delle HBIg durante la fase 1, il raggiungimento di un titolo anticorpale anti-HBs superiore a 1000 IU/L; non è stata prevista la sospensione della vaccinazione durante le fase 1 e 2.

Sono stati arruolati 18 pazienti di cui 13 e 5 rispettivamente di sesso maschile e femminile, e l'età media risultava di  $54 \pm 10$  anni. Tutti avevano effettuato il trapianto per cirrosi di classe B/C



di Child-Pugh; 6 (33,3%) si presentavano anti-HCV positivi, di cui 1 paziente risultata HCV-RNA negativo (responder ad un precedente trattamento con peg-interferon alfa-2° e ribavirina post-trapianto); 5 (27,7%) anti-HDV positivi ed 1 (5,6%) con entrambe le positività.

Il follow-up medio dal trapianto era di 73,8±38,7 mesi e tutti erano mantenuti con una profilassi di combinazione con HBIg (2000 U ev. con somministrazione “on demand” per titoli di anti-HBs inferiori a 100 UI/L) ed analogo nucleosidico Lamivudina, ove si eccettui l’associazione con Adefovir in 3 pazienti, da almeno 12 mesi. 16 pazienti (88,8%) erano in terapia con un singolo farmaco immunosoppressore, di cui 6 (33,3%) con Ciclosporina, 5 (27,7%) con Tacrolimus, 2 (11,1%) con Sirolimus e 3 (16,6%) con Micofenolato Mofetile. 2 pazienti (11,1%) assumevano una combinazione di Tacrolimus e Sirolimus o Tacrolimus e Micofenolato, rispettivamente. Per le caratteristiche di base dell’intera casistica (al momento dell’arruolamento), confronta la tabella N° 3. L’analisi statistica dei risultati è stata effettuata secondo “intention to treat”.

<b>Età (anni)</b>	<b>54,8 ± 10,3</b>
<b>BMI</b>	<b>25,3 ± 3,7</b>
<b>Follow-up post-OLT (mesi)</b>	<b>73,8 ± 38,7</b>
<b>HBsAg -</b>	<b>18 (100%)</b>
<b>HDV-Ab +</b>	<b>5 (27,7)</b>
<b>HCV-Ab +</b>	<b>6 (33,3%)</b>
<b>HCV-Ab + HDV-Ab +</b>	<b>1 (5,5%)</b>
<b>HCV-RNA +</b>	<b>5 (27,7%)</b>
<b>HBV-DNA – (&lt; 69 copie/mL)</b>	<b>18 (100%)</b>
<b>HBIG + Lamivudina</b>	<b>15 (83,3%)</b>
<b>HBIG + Lamivudina + Adefovir</b>	<b>3 (16%)</b>
<b>HBsAg/HBcAg +/+ (tessuto)</b>	<b>0</b>
<b>cccDNA + (tessuto)</b>	<b>0</b>
<b>Grading (Ishak)</b>	<b>1,78 ± 1,27</b>
<b>Staging (Ishak)</b>	<b>1,1 ± 0,8</b>
<b>Immunosoppressione (mono/combinazione)</b>	<b>16/2 (88%)</b>

Tabella N° 3. Dati anagrafici e clinici dei pazienti all’arruolamento

### ***Timing e realizzazione***

La progettazione di tale studio prospettico nasce nell'intento di mettere a punto una schedula vaccinale che rappresenti uno strumento efficace per effettuare una immunoprofilassi attiva nel paziente trapiantato di fegato per malattia HBV correlata, che permetta un considerevole risparmio economico rispetto all'impiego dell'attuale prevenzione con HBIg e Lamivudina e che migliori la qualità di vita dei pazienti, evitando la somministrazione delle HBIg per via parenterale "ad vitam".

L'efficacia complessiva può essere individuata nell'ottenimento di titoli anticorpali anti-HBs elevati, duraturi e che permettano di sospendere definitivamente l'immunoprofilassi passiva con HBIg, pur mantenendo una protezione ai massimi livelli. Ove possibile, lo studio si propone di fornire elementi che indirizzino verso la soluzione degli interrogativi che sono nati dal confronto dei principali trials di vaccinazione sopra riportati e che schematicamente sono stati individuati nelle tabelle N° 1 e 2. Inoltre, il raggiungimento di tali obiettivi potrebbe conferire dei vantaggi nel miglioramento della qualità di vita del paziente trapiantato ed una riduzione significativa e ben quantificabile della spesa sanitaria per la profilassi stessa.

Il protocollo di studio, così come è riportato nel paragrafo relativo alla metodologia, è stato esaminato dal Comitato Etico del Centro Trapianti dell'Università di Tor Vergata ed approvato nel mese di aprile 2006. Tutti i pazienti sono stati arruolati secondo dei criteri di inclusione, come riportato nella metodologia, dopo aver dato il loro consenso scritto.

La fase di identificazione del paziente arruolabile, l'arruolamento mediante prelievo di screening, l'ecografia dell'addome superiore e la biopsia epatica per la ricerca del cccDNA su tessuto epatico, così come le visite di controllo durante tutto lo studio ed il follow-up, e l'infusione delle HBIg nella prima fase dello studio (cfr. metodologia), sono state effettuate presso il Centro Trapianti dell'Università di Tor Vergata. La ricerca virologica del cccDNA su tessuto mediante PCR "nested" è stata effettuata presso la Cattedra di Virologia dell'Università di Tor Vergata, mentre l'analisi istologica del campione epatico prelevato mediante ago-biopsia con la valutazione quantitativa del grado di infiammazione e di fibrosi (secondo la

classificazione di Ishak del 1995), è stata condotta presso la Cattedra di Anatomia Patologia dell'Università di Tor Vergata.

Durante lo svolgimento dello studio non si sono rese necessarie modifiche allo schema protocollare approvato ed al progetto di realizzazione pianificato nella fase di allestimento del protocollo stesso, nonché nella partecipazione delle altre Unità a complemento del lavoro di coordinamento e svolgimento effettuato dal Centro Trapianti. Nessun emendamento al protocollo è stato necessario.

Gli arruolamenti si sono svolti nel periodo compreso tra maggio e settembre del 2006 e si stima che il follow-up trimestrale post-vaccinale dell'ultimo paziente arruolato si concluderà nel mese di marzo 2008. Vengono riportati i dati completi relativi ai primi 3 mesi di follow-up (3 mesi dopo il termine della vaccinazione completa svolta nelle fase 1 e 2 dello studio).

La somministrazione delle HBIg è stata effettuata in regime di Day Hospital, mentre la somministrazione delle 12 dosi di vaccino previste all'interno delle 2 fasi consecutive di studio, è stata effettuata presso il Centro per la profilassi dell'epatite virale della ASL RM C.

Nessun paziente arruolato è considerato drop out ed il livello di compliance è stato superiore al 90% per tutti i pazienti che hanno partecipato allo studio.

## 2.3 Risultati

La vaccinazione anti-HBV e la concomitante somministrazione di HBIg e Lamivudina si sono dimostrate molto ben tollerate in tutti i pazienti. Non si sono verificati eventi avversi seri e la compliance dei pazienti arruolati è stata di livello elevato in tutti i casi. Non si sono registrati effetti collaterali, sia generali che legati all'assunzione del vaccino, sia localmente nella sede di somministrazione che a livello sistemico, ove si eccettui la comparsa di prurito generalizzato, senza evidenti lesioni cutanee in un solo caso. L'esordio è coinciso con la terza somministrazione ed è regredito completamente entro 30 giorni di terapia antiistamica, senza recidiva del sintomo alla sospensione. Non si sono registrati casi di ricorrenza di infezione da HBV durante le fasi di vaccinazione e nel follow-up fino ad oggi effettuato. L'intera casistica ha completato la fase 2 dello studio ed i 3 mesi di follow-up successivi. Tutti i pazienti, al termine dei primi 3 mesi di follow-up e 9 mesi dopo la sospensione delle HBIg erano HBsAg ed HBV-DNA negativi.

Per ciò che riguarda l'efficacia della vaccinazione, misurata secondo i criteri riportati nel paragrafo precedente, si possono distinguere le 2 fasi di vaccinazione ed il successivo follow-up. Al termine della fase 1, 9 pazienti (50%) sono risultati *responders*, ovvero hanno riportato un incremento del titolo anticorpale anti-HBs superiore a 100 IU/L rispetto al baseline; la misurazione finale è stata ottenuta 1 mese dopo la sesta dose di vaccino, ovvero l'ultima somministrazione di HBIg ed immediatamente prima dell'inizio della seconda fase di vaccinazione. La media del titolo anticorpale anti-HBs misurata al baseline era di  $211 \pm 158$  UI/L, mentre quella calcolata al termine della fase 1 era di  $389 \pm 445$  UI/L. Il delta calcolato sui valori di media e deviazione standard del titolo anticorpale al baseline ed al termine della fase 1, è risultato di  $+177 \pm 287$  UI/L. Per la stratificazione dei pazienti in base ai livelli di titoli anticorpali anti-HBs al termine della fase 1 di vaccinazione, confronta la tabella N° 4 sotto riportata.

Anti-HBs (UI/L)	>500 UI/L	>100 UI/L	>10<100 UI/L	<10 UI/L
<b>TERMINE DELLA FASE 1 (1 mese dopo la 6a dose di vaccino)</b>	<b>2/18 (11,1%)</b>	<b>17/18 (94,4%)</b>	<b>1/18 (5,5%)</b>	<b>0/18</b>

Tabella N° 4. Numero e percentuale di pazienti secondo diversi livelli di titolo anticorpale anti-HBs al termine della fase 1 di vaccinazione

Al termine della fase 2, ovvero un mese dopo l'ultima dose di vaccino, 10 (55,5%) pazienti risultavano *responders*, ovvero avevano un titolo anticorpale anti-HBs superiore a 100 IU/L (833±846 UI/L). La media del titolo anticorpale anti-HBs calcolata su tutti i pazienti risultava di 463±748 IU/L. Il delta calcolato sui valori di media e deviazione standard del titolo anticorpale al termine della fase 1 ed al termine della fase 2, è risultato di +74±571 UI/L. Per la stratificazione dei pazienti in base ai livelli di titoli anticorpali anti-HBs al termine della fase 2 di vaccinazione, confronta la tabella N° 5 sotto riportata.

Anti-HBs (UI/L)	>500 UI/L	>100 UI/L	>10<100 UI/L	<10 UI/L
<b>TERMINE DELLA FASE 2 (1 mese dopo la 12a dose di vaccino)</b>	<b>5/18 (27,7%)</b>	<b>10/18 (55,5%)</b>	<b>1/18 (5,5%)</b>	<b>7/18 (38,8%)</b>

Tabella N° 5. Numero e percentuale di pazienti secondo diversi livelli di titolo anticorpale anti-HBs al termine della fase 2 di vaccinazione

Infine, al termine dei primi 3 mesi di follow-up, ovvero 3 mesi dopo l'ultima dose di vaccino o 9 mesi dopo l'ultima dose di HBIG, 9 (50%) pazienti avevano un titolo anticorpale di anti-HBs superiore a 100 IU/L (510±427 UI/L). La media del titolo anticorpale anti-HBs calcolata su tutti i pazienti risultava di 258±391 IU/L. Il delta calcolato sui valori di media e deviazione standard del titolo anticorpale al termine della fase 2 e dopo 3 mesi di follow-up, è risultato di -205±357

UI/L. Per la stratificazione dei pazienti in base ai livelli di titoli anticorpali anti-HBs al termine dei primi 3 mesi di follow-up, confronta la tabella N° 6 sotto riportata.

Anti-HBs (UI/L)	>500 UI/L	>100 UI/L	>10<100 UI/L	<10 UI/L
<b>TERMINE DI 3 MESI DI FOLLOW-UP (3 mesi dopo la 12a dose di vaccino e 9 mesi dopo l'ultima dose di HBIg)</b>	<b>3/18 (16,6%)</b>	<b>9/18 (50%)</b>	<b>2/18 (11,1%)</b>	<b>7/18 (38,8%)</b>

Tabella N° 6. Numero e percentuale di pazienti secondo diversi livelli di titolo anticorpale anti-HBs al termine dei primi 3 mesi di follow-up.

3 (16,6%) pazienti definiti *responders* alla fase 1 non sono risultati *responders* alla fase 2; viceversa 4 pazienti (22,2%) *non-responders* alla fase 1, sono risultati *responders* alla fase 2.

Non si riconoscono elementi caratterizzanti nell'andamento delle cinetiche del titolo anticorpale dei pazienti *responder* e *non-responder* durante la fase 1 dello studio, ove si eccettui i due casi dei pazienti n° 2 e 17, in cui dopo 1 e 3 dosi di vaccino rispettivamente, si è evidenziato un incremento spontaneo del titolo anticorpale molto significativo e che ha fatto registrare un delta baseline vs. fine della fase 1 pari a 473 (da 56 a 529 UI/L) e 1969 UI/L (da 131 a 2100 UI/L), rispettivamente. Questi pazienti hanno mantenuto la risposta anticorpale elevata durante la fase 2 ed entrambi risultavano avere un titolo anticorpale anti-HBs superiore a 500 UI/L al termine dei 3 mesi di follow-up (670 e 780 UI/L, rispettivamente).

Nella fase 2 della vaccinazione, la cinetica del titolo di anti-HBs nei pazienti *responder* ha mostrato un incremento significativo del titolo anticorpale anti-HBs nel periodo compreso fra la nona e la dodicesima somministrazione di vaccino in 6 pazienti (n° 2, 5, 7, 8, 11, 17). Tuttavia i “flares” anticorpali registrati, hanno mostrato in tutti i casi un andamento “a campana”, in cui al rapido incremento è seguita sempre una riduzione del titolo anticorpale più o meno significativa.

Per l'andamento del titolo anticorpale anti-HBs durante la prima e la seconda fase e nei primi 3 mesi di follow-up confronta il grafico N° 1.

Si attendono i risultati del termine dei sei mesi di follow-up, ovvero dei 12 mesi dalla sospensione delle HBIG.

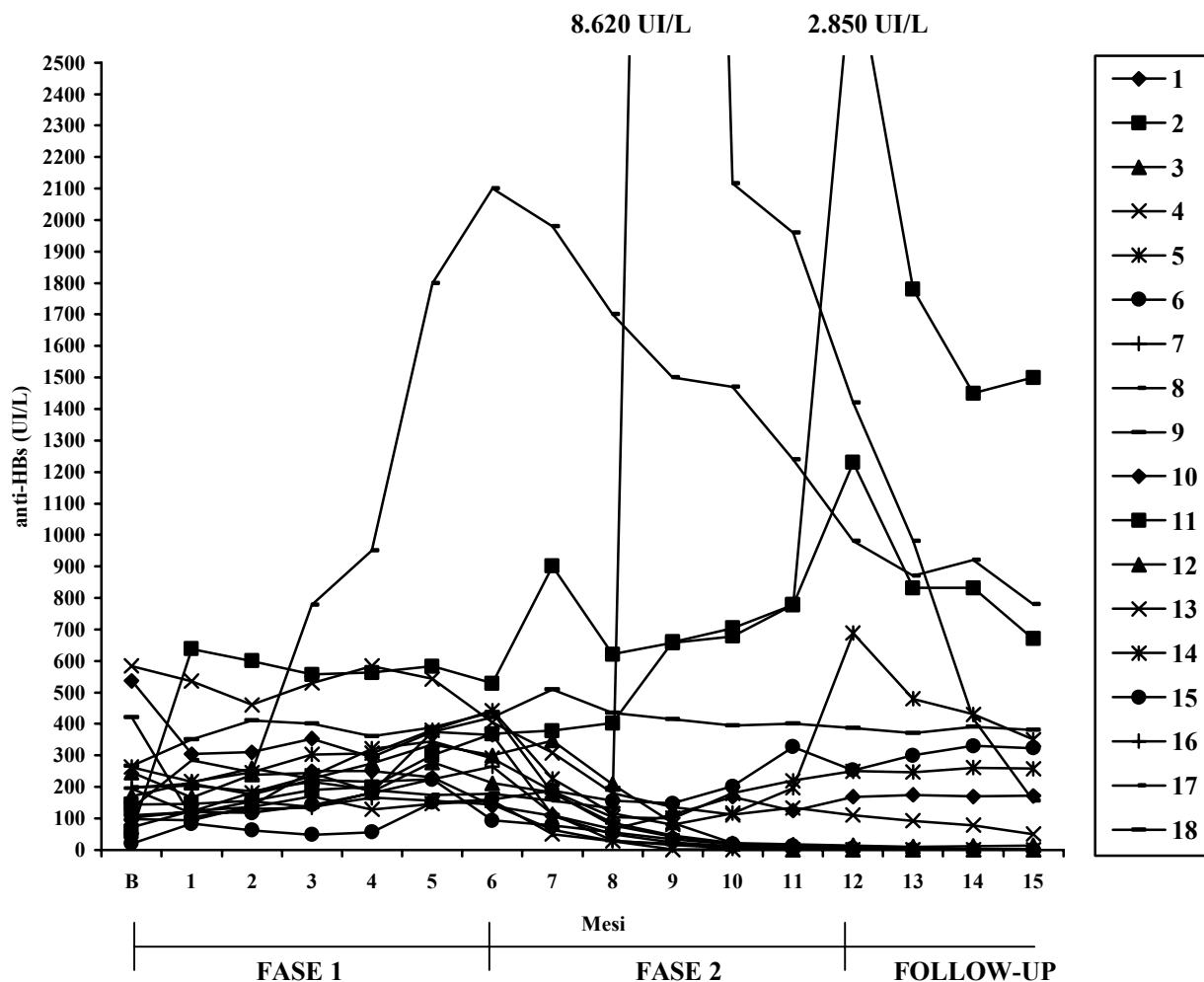


Grafico N° 1. Cinetica del titolo anticorpale anti-HBs durante le fasi 1, 2 e di follow-up nell'intera casistica.

E' stata effettuata l'analisi multivariata (secondo la Multinomial Logistic Regression) per individuare i fattori che hanno influenzato positivamente la risposta alla vaccinazione, eseguita considerando i pazienti *responder e non-responder* di entrambe le fasi di vaccinazione e al follow-up, secondo i parametri del sesso, età, indice di massa corporea (BMI), coinfezione con HDV o HCV, ed il follow-up dal trapianto. L'età del paziente al momento dell'arruolamento nello studio è risultata l'unico fattore che correla in modo significativo con la risposta alla vaccinazione ( $p=0.036$ , coefficiente di regressione=0.23 ed Odds ratio=1.26).



## 2.4 Discussione

La sopravvivenza a 10 anni dopo trapianto di fegato per malattia HBV correlata ha raggiunto e superato quella di tutte le altre indicazioni al trapianto di fegato grazie all'utilizzo delle HBIg fin dalla fase anepatica dell'intervento e successivamente "ad vitam" in un primo tempo, e grazie all'associazione delle HBIg e della Lamivudina successivamente (cfr. grafico n° 2).

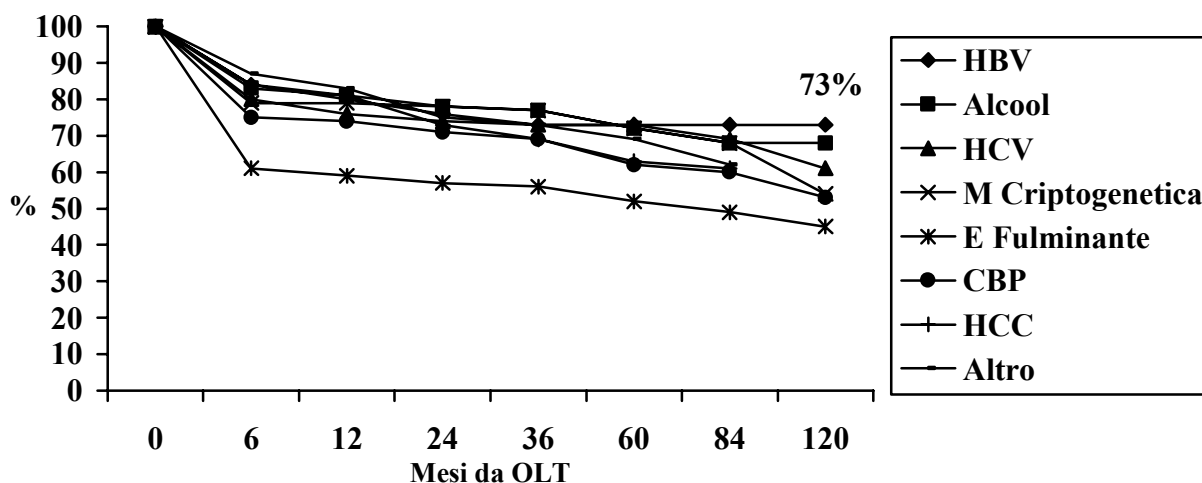


Grafico N° 2. Sopravvivenza post-trapianto di fegato secondo le indicazioni al trapianto sesso (L'esperienza italiana; DLD 2002, Fagioli S et al.<sup>54</sup>).

Attualmente il gold standard della prevenzione della ricorrenza di infezione e malattia da HBV post-trapianto di fegato rimane l'associazione delle HBIg somministrate regolarmente e della Lamivudina. La percentuale di ricorrenza di infezione da HBV nei pazienti che hanno effettuato il trapianto in assenza o con minimi livelli di replicazione virale ( $HBV-DNA < 10^5$  copie/ml) e che successivamente hanno ricevuto una adeguata immunoprofilassi, si attesta oggi ad una percentuale al di sotto del 10%.

Questo straordinario successo, iniziato nei primi anni 90, si è consolidato ed ottimizzato nella seconda metà degli anni 90 grazie alla disponibilità di antivirali potenti e ben tollerati come la Lamivudina, che ha di fatto permesso il trapianto di fegato in molti pazienti con malattia da HBV

attiva se assunta prima del trapianto stesso e successivamente in associazione alle HBIg, indefinitamente.

Tuttavia, l'utilizzo a lungo termine delle HBIg, che sono da sempre molto ben tollerate, si associa ad una serie di effetti "negativi" direttamente riconducibili all'immunoprofilassi passiva continuativa. Infatti, i costi estremamente elevati (che raggiungono e superano quelli del trapianto stesso in 3 anni circa dall'intervento), e la dipendenza dalla somministrazione endovenosa o intramuscolare regolare "ad vitam" delle HBIg, riduce significativamente la qualità di vita soprattutto nei pazienti giovani.

Molto è stato fatto per migliorare questi aspetti "negativi" legati alle HBIg; la somministrazione di dosaggi più bassi e solo quando il titolo anticorpale scende al di sotto dei livelli protettivi (somministrazione "on demand") ha permesso di ridurre sia i costi che il numero di somministrazioni; la sospensione "controllata" delle HBIg in categorie ben selezionate di pazienti trapiantati, quindi in coloro che hanno effettuato il trapianto da un lungo periodo ed in condizioni di HBV-DNA negatività, pur mantenendo la Lamivudina in monoterapia, non si è accompagnata ad un incremento significativo della percentuale di recidiva di infezione. Tuttavia, l'individuazione del soggetto a rischio molto basso di ricorrenza è difficile e a tutt'oggi non esistono metodiche di ricerca di HBV collaudate, di sensibilità e specificità tanto elevate da permettere la sospensione definitiva delle HBIg con totale sicurezza. Ci sono evidenze che una percentuale non trascurabile di pazienti, anche a 10 anni dal trapianto, mantengono HBV negli epatociti in forma latente e come tali sono sempre a rischio di recidiva e non possono effettuare la sospensione delle HBIg in sicurezza.

Dunque, l'immunoprofilassi attiva mediante vaccinazione anti-HBV, almeno in linea teorica, potrebbe risolvere tutti i problemi legati all'immunoprofilassi passiva, pur conferendo un livello di protezione totale nei confronti del rischio di ricorrenza di infezione da HBV. Infatti una risposta efficace e duratura alla vaccinazione, attraverso la produzione di anticorpi anti-HBs a titolo protettivo ( $> 100$  UI/L) e duraturo, permetterebbe la sospensione completa e definitiva della strategia di prevenzione con la combinazione di HBIg ed un analogo nucleos(t)idico.

Inoltre, permetterebbe l'abbattimento dei costi legati alla profilassi, oltre a portare un miglioramento della qualità di vita del paziente, che non sarebbe più costretto a tornare in ospedale ogni uno o due mesi per tutta la vita, per ricevere le HBIg.

I trials fin qui condotti per testare la fattibilità e l'efficacia della vaccinazione anti-HBV come strategia di prevenzione della ricorrenza di infezione da HBV, seppur con percentuali di successo complessivamente basse, con schedule di somministrazione molto diverse tra loro, con preparazioni vaccinali ed adiuvanti eterogenee, con follow-up molto limitati e con casistiche molto piccole, hanno comunque dimostrato che la vaccinazione in questa categoria di pazienti è possibile e può conferire un adeguato livello di protezione. A tutt'oggi, non sono noti i fattori che riducono così tanto l'immunogenicità del vaccino anti-HBV in questi pazienti rispetto ai soggetti immunocompetenti, e tutti i tentativi di incrementarne l'efficacia attraverso il raddoppiamento della dose o il prolungamento del periodo di vaccinazione o la somministrazione ravvicinata delle dosi, non si è tradotto in un incremento significativo delle risposte anticorpali. Si può calcolare, grossolanamente, che la vaccinazione con vaccino standard ricombinante S adiuvato da alluminio con preparazione standard ha una efficacia complessiva che non supera il 25% dei pazienti, considerando protettivo un titolo anticorpale anti-HBs superiore a 100 UI/L.

Tutto ciò si può affermare, ove si eccettui l'unica esperienza clinica del gruppo tedesco (Bienze et al) che è stata riportata con il vaccino ricombinante S adiuvato da MPL (cfr. paragrafo 1.4), che avrebbe dimostrato come l'aggiunta di tale molecola adiuvante possa incrementare la percentuale di risposta, con titoli anticorpali molto elevati, fino all'80% dei casi. Sfortunatamente, tali risultati non sono stati confermati successivamente in casistiche adeguate.

Dunque, a tutt'oggi rimangono aperti una serie di interrogativi sull'utilizzo "allargato o routinario" della vaccinazione anti-HBV post-trapianto di fegato per malattia HBV correlata e sulla sua reale efficacia come strategia di prevenzione alternativa alla combinazione di HBIg e Lamivudina.

Questo studio, con la schedula vaccinale proposta e con l'utilizzo dell'adiuvante MPL, si proponeva di chiarire parte di punti aperti sulla vaccinazione anti-HBV post-trapianto di fegato,

come sono stati schematizzati nel paragrafo 1.4 e principalmente quello relativo al ruolo dell'adiuvante MPL, che dopo l'esperienza tedesca, sembra essere uno dei fattori che più significativamente influenza l'efficacia della vaccinazione in questa categoria di pazienti.

Nella tabella n° 7 è riportato il confronto in termini di sviluppo di anticorpi anti-HBs al termine del follow-up dello studio tedesco e del presente studio.

Anti-HBs (UI/L)	>1000	>500	>100	>10
<b>Di Paolo et al (N° pz/%)</b>	<b>1 (5,5%)</b>	<b>3 (16,6%)</b>	<b>9 (50%)</b>	<b>11 (61,1%)</b>
<b>Bienzle et al (N° pz/%)</b>	<b>14 (70%)</b>	<b>14 (70%)</b>	<b>16 (80%)</b>	<b>20 (100%)</b>

Tabella N° 7. Confronto fra lo studio tedesco di Bienzle et al. ed il presente studio in base al titolo anticorpale anti-HBs misurabile al termine del follow-up.

Il presente studio ha riportato una percentuale di successo pari al 50% dei pazienti e tale risultato di colloca ben al disopra degli studi effettuati fino ad oggi con il vaccino standard S adiuvato dall'alluminio e conferma la possibile sostituzione della strategia di prevenzione con HBIg e Lamivudina con la vaccinazione anti-HBV. Diversamente, questi risultati evidenziano come nonostante una schedula vaccinale molto rinforzata, quindi di lunga durata (12 mesi) e con dosi ravvicinate (mensili), nonché con l'utilizzo dell'adiuvante MPL, si riesca a proteggere con titoli anticorpali protettivi (>100 UI/L) solo la metà dei pazienti. Inoltre, in tutti i casi, compresi coloro che hanno sviluppato un titolo anticorpale elevato durante la vaccinazione, si è evidenziata la tendenza alla riduzione più o meno rapida del titolo stesso sul finire della vaccinazione o nel breve follow-up successivo. Dunque i risultati riportati non confermano pienamente quelli mostrati nel lavoro tedesco, nonostante l'adozione di una schedula più lunga e rinforzata, nonché

le forti analogie fra le casistiche vaccinate, considerando i fattori dipendenti dalla malattia pretrapianto e quelli trapianto-dipendenti come la terapia immunosoppressiva.

La maggior parte delle risposte si è avuta nella seconda fase della vaccinazione e tardivamente dopo la decima dose; dunque le future schedule vaccinali, in questa categoria di paziente, dovrebbero essere quantomeno estese oltre le sei dosi.

Rimane da chiarire il ruolo della Lamivudina e delle HBIg somministrate durante la vaccinazione, come fattori in grado di aumentare l'immunogenicità del vaccino stesso. Appare comunque non determinante il loro ruolo; infatti, verosimilmente, la Lamivudina non esercita il suo ruolo di "recupero" dell'immunità in assenza di virus B replicante. Per le HBIg, il vantaggio della costituzione dell'immunocomplesso con la proteina HBsAg vaccinale appare assente; infatti durante la fase 1 della vaccinazione, l'andamento del titolo anticorpale sierico anti-HBs si è dimostrato completamente dipendente dalla sola somministrazione delle HBIg stesse in tutti i casi, un singolo caso a parte. Inoltre, non è noto se tutti i pazienti che hanno risposto alla vaccinazione e che successivamente dovessero perdere il titolo anticorpale protettivo (anti-HBs <100 IU/L), possano essere di nuovo stimolati efficacemente con dosi vaccinali di richiamo. I due case report riportati dal gruppo italiano con un follow-up di oltre 4 anni, sembrerebbe dimostrare che è possibile (cfr. paragrafo 1.4).

In passato, una delle ipotesi che era stata chiamata in causa come fattore in grado di ridurre l'efficacia della vaccinazione in questi pazienti era la persistenza di HBV in forma latente, magari sotto forma di cccDNA, negli epatociti. Questa condizione avrebbe continuato a rendere anergico il sistema immune, soprattutto nei confronti delle proteine virali HBsAg e non solo, prodotte in minima quantità o comunque presenti nel fegato. Questa ipotesi è stata smentita dalla ricerca di HBV (e di cccDNA) direttamente sul fegato prelevato mediante ago-biopsia epatica in tutta la casistica oggetto di questo studio. Tutti i pazienti sono risultati negativi per la persistenza di HBV negli epatociti, ma permangono le differenze nei confronti della risposta alla vaccinazione rispetto ai pazienti naive per HBV ed immunocompetenti.

Non sembra che l'assunzione del cut-off di 10 UI/L come titolo di anti-HBs protettivo sia adeguato per questa categoria di pazienti; 100 UI/L è il livello minimo ritenuto protettivo per il paziente immunocompromesso che è a rischio di ricorrenza di infezione da HBV, almeno a partire al 2° anno dal trapianto. Verosimilmente, nel primo anno ed in particolare nei pazienti che hanno effettuato il trapianto in condizioni di HBV-DNA positività, il titolo anticorpale considerabile protettivo deve essere di 500 IU/L. Per tale motivo, la vaccinazione anti-HBV come strategia di prevenzione alternativa alle HBIg, ad oggi appare proponibile solo a partire dal 2° anno di follow-up post-trapianto ed in pazienti a basso rischio di ricorrenza di infezione (HBV-DNA  $<10^5$  copie/mL o negativo al trapianto).

Dunque, sarà di fondamentale importanza per confermare lo spazio significativo che sembra aver ottenuto la vaccinazione anti-HBV dopo trapianto di fegato per malattia da HBV, osservare la durata delle risposte anticorpali ottenute. E' prevedibile che questa sia significativamente lunga, in quanto ciò che è stato riportato 3 mesi dopo il termine della vaccinazione, in realtà, veniva registrato a 9 mesi dalla sospensione completa della somministrazione delle HBIg.

Si calcola che dal 1992 al 2004, secondo il registro del Centro Nazionale Trapianti, in Italia sono stati effettuati 7.486 trapianti di fegato, di cui il 21% (n=1.572) per malattia epatica da HBV. Considerando che la sopravvivenza media del trapianto di fegato per cirrosi da HBV in Italia, sempre secondo i dati del CNT, a 10 anni è dell'83%, ci sarebbero in Italia 1.304 pazienti in profilassi con HBIg. Se una dose di HBIg (Hepatect® 2000 UI/L, fiale per uso endovenoso) costa mediamente 701,00 €, si impiegano 8.412,00 € per mantenere un paziente con HBIg per un anno con dosi mensili. Se una compressa di Lamivudina (Zeffix® 100 mg, compresse) costa 3,32 €, si impiegano 1.195,00 € per mantenere un paziente per un anno con la Lamivudina. Dunque, la combinazione di HBIg al dosaggio di 2000 UI/mese e della Lamivudina al dosaggio di 100 mg/die hanno un costo annuale di circa 9.607,20 € per paziente.

Pertanto la spesa annuale sostenuta in Italia per la immunoprofilassi con HBIg e Lamivudina è approssimativamente di 12.527.788,00 €. Ipotizzando un'efficacia del 50% della vaccinazione anti-HBV, il costo per la profilassi con HBIg e Lamivudina in Italia si ridurrebbe della metà, con un risparmio annuo di 6.263.894,00 €.

### 3. Bibliografia

1. Margolis HS et al. Hepatitis B: evolving epidemiology and amplications for control. *Semin Liver Dis* 1991;11:84-92.
2. Lee W. Hepatitis B infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-1745.
3. The EASL Jury. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. *J Hepatol* 2003;S3-S25.
4. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-1129.
5. Bellentani S et al. Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos Study. *Hepatology* 1994;20:1442-1449.
6. McQuillan GM et al. Prevalence of hepatitis B virus infection in the United States: the National health and Nutrition Examination Survey, 1976 through 1994. *Am J public Health* 1999;89:14-18.
7. Rodriguez-Mendez ML et al. Prevalence, patterns and corse of past hepatitis B virus infection in intravenous drug users with HIV-1 infection. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1316-1322.
8. Lemon SM, Thomas DL. Vaccines to prevent viral hepatitis. *N Engl J Med* 1997;336:196-204.
9. Mast EE et al. Progress toward elimination of hepatitis B virus transmission in the United States. *Vaccine* 1998;16:S48-S51.
10. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Ann Rev Immunol* 1995;13:29-60.
11. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005;5:215-229.
12. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68.
13. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease. *Hepatology* 1995;22:1316-25.
14. Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Current Opinion in Immunology* 1996;8:478-483.



15. Giudotti LG, Chisari FV. Intracellular inactivation of hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:25-36.
16. Raimondo G et al. Occult hepatitis B infection. *J Hepatol* 2007;46:160-170.
17. Urbani S et al. Acute phase HBV-specific T cell responses associated with HBV persistence after HBV/HCV coinfection. *Hepatology* 2005;41:826-831.
18. Di Marco V et al. The long-term course of chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999;30:257-264.
19. Yeo W, Johnson PJ. Diagnosis, prevention and management of hepatitis B virus reactivation during anticancer therapy. *Hepatology* 2006;43:209-20.
20. Marzano A et al. Prophylaxis and treatment of hepatitis B in immunocompromised patients. *Dig Liv Dis* 2007;39:397-408.
21. Lok AS, Lai CL. A longitudinal follow-up of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive Chinese children. *Hepatology* 1988;8:1130-1133.
22. Chang MH et al. The significance of spontaneous hepatitis e antigen seroconversion in childhood: with special emphasis on the clearance of hepatitis e antigen before 3 years of age. *Hepatology* 1995;22:1387-1392.
23. Guidotti LG et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999;284:825-829.
24. Thimme R et al. CD8+ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003;77:68-76.
25. Yuen MF et al. HbsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological and clinical aspects. *Hepatology* 2004;39:1694-1701.
26. Tassopoulos NC et al. Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults. *Gastroenterology* 1987;92:1844-1850.
27. Prekh S et al. Genome replication, virion secretion and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J Virol* 2003;77:6601-6612.
28. Scaglioni PP et al. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* 1997;233:374-381.

29. Hadziyannis SJ. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: from clinical recognition to pathogenesis and treatment. *Viral Hepat Rev* 1995;1:7-36.
30. McMahon BJ. Hepatocellular carcinoma and viral hepatitis. In: Wilson RA, ed. *Viral hepatitis*. New York: Marcel Dekker 1997;315-330.
31. Fattovich G et al. Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western european patients with cirrhosis type B. The EUROHEP study group on hepatitis B virus and cirrhosis. *Hepatology* 1995;21:77-82.
32. Sherman M et al. Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology* 1995;22:432-437.
33. Craxì A, Yurdaydin C. From viral pathobiology to the treatment of hepatitis B virus infection ESAL Monothematic Conference (Instambul, Turkey, October 6-8, 2005). *J Hepatol* 2006;44:1186-1195.
34. Lau G et al. Peginterferon alfa-2a as monotherapy and in combination with lamivudine versus lamivudine monotherapy in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005.
35. Marcellin P et al. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004;351:1206-1217.
36. Di Marco V et al. Clinical outcome of HBeAg-negative chronic hepatitis B in relation to virological response to lamivudina. *Hepatology* 2004;40:883-891.
37. Boni C et al. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 2001;33:963-971.
38. Tassopoulos NC et al. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. lamivudine precore mutant study group. *Hepatology* 1999;29:889-896.
39. Hadziyannis SJ et al. Efficacy of long-term lamivudine monotherapy in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000;32:847-51.

40. Lok AS et al. Long term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003;125:1714-1722.
41. Tipples GA et al. Mutation in the HBV RNA dependent DNA polymerase confer resistance of lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996;24:714-717.
42. Liaw YF, Sung JJ, Chow WC et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004;351:1521-1531.
43. Hadziyannis S et al. Adefovir Dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003;348:800-807.
44. Hadziyannis S et al. Long-term Adefovir Dipivoxil treatment induces regression of liver fibrosis in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: results after 5 years of therapy. *Hepatology* 2005;42:754A.
45. Snow A et al. Combination of Adefovir Dipivoxil (ADV) and Lamivudina (LAM) prevented emergence of ADV resistance mutations in chronic hepatitis B (CHB) patients with LAM-resistant HBV. *Gastroenterology* 2005;128:M945.
46. Lee YS et al. Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy. *Hepatology*. 2006;43:1385-91.
47. Fung SK et al. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2006;44:283-90.
48. Lai CL et al. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006;354:1011-1020.
49. Tenney DJ et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3498-3507.
50. Van Bommel F et al. Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004;40:1421-1425.

51. Lai CL et al. A 1-year trial of telbivudine, lamivudine and the combination in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2005;129:528-536.
52. Protzer-knolle U et al. Hepatitis B virus with antigenically altered HBsAg is selected by high-dose hepatitis B immunoglobulin after liver transplantation. *Hepatology* 1998;27:254-263.
53. Ghany MG et al. Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1998;27:213-222.
54. Fagioli S et al. Liver transplantation: the Italian experience. *Dig Liver Dis* 2002;34:640-648.
55. Yao FY et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. Expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001;33:1394-1403.
56. Burra P et al. Liver transplantation in Italy: current status. *Dig Liver Dis* 2000;32:249-256.
57. Samuel D et al. Liver transplantation in European patients with the hepatitis B surface antigen. *New Engl J Med* 1993;329:1842-1847.
58. EASL Jury. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. *J Hepatol* 2003;38:533-540.
59. Lok AS. Hepatitis B: progress in the last decade. *Semin Liver Dis* 2003;23:1-4.
60. Samuel D et al. Report of the monothematic EASL conference on liver transplantation for viral hepatitis (Paris, France, January 12-14, 2006). *J Hepatol* 2006;45:127-143.
61. Lau DT. Lamivudine for chronic delta hepatitis. *Hepatology* 1999;30:546-549.
62. Wall WJ. Recurrent disease after liver transplantation: implications for the future. *Liver Transplantation and Surgery* 1997;3:S62-S67.
63. Collins BH et al. Long term results of liver transplantation in older patients 60 years of age and older. *Transplantation* 2000;70:780-783.
64. Herrero JI et al. Liver transplantation recipients older than 60 years have lower survival and higher incidence of malignancy. *American J Transpl* 2003;3:1407-1412.

65. Shouval D et al. Hepatitis B immune globulin to prevent hepatitis B virus graft reinfection following liver transplantation : a concise review. *Hepatology* 2000;32:1189-1195.
66. Perrillo et al. A multicenter United States-Canadian trial to assess lamivudine monotherapy before and after liver transplantation for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;33:424-432.
67. Marzano A et al. Prevention of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation in cirrhotic patients treated with lamivudine and passive immunoprophylaxis. *J Hepatol* 2001;34:903-910.
68. Schiff E et al. Adefovir dipivoxil therapy for lamivudine-resistant hepatitis B in pre- and post-liver transplantation patients. *Hepatology* 2003;38:1419-1427.
69. Di Paolo D et al. Low-dose hepatitis B immunoglobulin given “on demand” in combination with lamivudine: a highly cost-effective approach to prevent recurrent hepatitis B virus infection in the long-term follow-up after liver transplantation. *Transplantation* 2004;77:1203-1208.
70. Todo S et al. Orthotopic liver transplantation for patients with hepatitis B virus-related liver disease. *Hepatology* 1991;13:619-26.
71. O’Grady JG et al. Hepatitis B virus re-infection after orthotopic liver transplantation. Serological and clinical implications. *J Hepatol* 1992;14:104-111.
72. Samuel D et al. Passive immunoprophylaxis after liver transplantation in HBsAg-positive patients. *Lancet* 1991 ;337 :813-815.
73. Seaberg Ec et al. Liver transplantation in the United States from 1987-1998 : update results from the Pitt-UNOS liver transplant registry. In: Cecka JM, Terasaki PI, eds. *Clinical transplant 1998*. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1999:17-37.
74. Berenguer M et al. Antiviral therapy pre and post-transplantation. In: *Transplantation of the liver*. Maddrey W et al. Ed. Lippincott Williams & Wilkins 2000:343-360.
75. United Network for Organ Sharing Web Site. Available at liver transplant. Accessed January 31, 2000.

76. European Liver Transplant Registry – ELTR. Registry for the European liver transplant association, data analysis, 05/1968-12/2000, <http://www-eltr.vjf.inserm.fr>.
77. Terrault N et al. Management of the hepatitis B virus in the liver transplantation setting : a european and an american perspective. *Liver Transpl* 2005;11:716-732.
78. Munoz SJ et al. Use of hepatitis B core antibody-positive donors for liver transplantation. *Clin Liver Dis* 2003;7:573-584.
79. De Villa VH et al. Hepatitis B core antibody positive graft : recipients risk. *Transplantation* 2003;75:S49-S53.
80. Abdelmalek MF et al. Subclinical reactivation of hepatitis B virus in liver transplant recipients post exposure. *Liver Transpl* 2003;9:1253-1257.
81. Ghisetti V et al. Occult hepatitis B virus infection in HBsAg negative patients undergoing liver transplantation: clinical significance. *Liver Transpl* 2004;10:132-139.
82. Roque-Alfonso AM et al. Antibodies to hepatitis B surface antigen prevent viral reactivation in recipients of liver grafts from anti-HBc positive donors. *Gut* 2002;50:95-99.
83. Singh G et al. Using hepatitis-positive donors for solid organ transplantation. *Current Opinion in Organ Tranpl* 2003;8:341-347.
84. Nery JR et al. Use of graft from donors positive for antihepatitis B-core antibody (anti-HBc) in the area of prophylaxis with hepatitis-B immunoglobulins and Lamivudine. *Tranplantation* 2003;75:1179-1186.
85. Feray C et al. Persistent hepatitis B virus infection of monuclear cells without concomitant liver infection : transplantation model. *Transplantation* 1990;49:1155-1158.
86. Trautwein C et al. Hepatitis B virus mutation in pre-S genome before and after liver transplantation. *Hepatology* 1996;24:482-488.
87. Carman WF et al. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996;24:489-493.

88. Terrault NA et al. Incidence and clinical consequences of surface and polymerase gene mutations in liver transplant recipients on hepatitis B immunoglobulin. *Hepatology* 1998;28:555-561.
89. Philips MJ et al. Post-transplant recurrent hepatitis B viral liver disease. Viral-burden, steato-viral and fibroviral hepatitis. *Am J Pathol* 1992;140:1295-1308.
90. Davies S.E., Portaman B.C. et al. Hepatic histological findings after liver transplantation for hepatitis B virus infection, including a unique pattern of fibrosing cholestatic hepatitis. *Hepatology* 1991; 13: 150-157
91. Lau JYN et al. High-level expression of hepatitis B viral antigens in fibrosing cholestatic hepatitis. *Gastroenterology* 1992;102:956-962.
92. Demetris AJ et al. Evolution of hepatitis B virus liver disease after hepatic replacement. Practical and theoretical considerations. *Am J Pathol* 1990;137:667-676.
93. Tur-Kaspa R et al. Corticosteroids stimulate hepatitis B virus DNA, mRNA and protein production in a stable expression system. *J Hepatol* 1990;11:34-36.
94. Chazouilleres O et al. "Occult" hepatitis B viral infection: an important source of transmission to the liver transplant recipient. *Lancet* 1994;343:142-146.
95. Prieto M et al. De novo hepatitis B after liver transplantation from hepatitis B core antibody-positive donors in an area with high prevalence of anti-HBc positivity in the donor population. *Liver Transplantation* 2001;7:51-58.
96. Dickson RC et al. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney disease liver transplantation database. *Gastroenterology* 1997;113:1668-1674.
97. Crespo J et al. Severe clinical course of de novo hepatitis B infection after liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1999;5:175-183.
98. Perrillo R et al. Multicenter study of lamivudine therapy for recurrent hepatitis B after liver transplantation. *Hepatology* 1999;29:1581-1586.

99. Fontana RJ et al. A multicenter study of lamivudine treatment in 33 patients with hepatitis B after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001;7(6):504-510.
100. Rayes N et al. Comparison of famciclovir and lamivudine in the long-term treatment of hepatitis B infection after liver transplantation. *Transplantation* 2001;71:96-1001.
101. Terrault NA et al. Interferon alpha for recurrent hepatitis B infection after liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1996;2:132-138.
102. Al Faraid K et al. Alteration of the dismal natural history of fibrosing hepatitis cholestatic hepatitis secondary to hepatitis B virus with the use of lamivudine. *Transplantation* 1997;64:926-928.
103. Nery JR et al. Efficacy of lamivudine in controlling hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Transplantation* 1998;65:1615-1621.
104. Ben-Ari Z et al. Long-term experience with lamivudine therapy for hepatitis B virus infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001;7:113-117.
105. Andreone P et al. Lamivudine treatment for acute hepatitis B after liver transplantation. *J Hepatol* 1998;29:985-989.
106. Malkan G et al. Lamivudine for hepatitis B in liver transplantation. *Transplantation* 2000;69:1403-1407.
107. Locarini S. Hepatitis B virus surface antigen and polymerase gene variants : potential virological and clinical significance. *Hepatology* 1998;27:294-297.
108. Tipples GA et al. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996;24:714-717.
109. Allen M et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 1998;27:1670-1677.
110. Chayama Y et al. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998;27:1711-1719.



111. Xiong X et al. Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to Adefovir in vitro. *Hepatology* 1998;28:1669-1673.
112. Perrillo R et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants. *Hepatology* 2000;32:129-134.
113. Mutimer D et al. Acute liver graft failure due to emergence of lamivudine resistant hepatitis B virus: rapid resolution during treatment with Adefovir. *Gut* 2001;49:860-863.
114. Walsh KM et al. Successful treatment with Adefovir dipivoxil in a patient with fibrosing cholestatic hepatitis and lamivudine resistant hepatitis B virus. *Gut* 2001;49:436-440.
115. Neff GW et al. Tenofovir therapy for lamivudine resistance following liver transplantation. *Ann Pharmacother* 2004;12:1999-2004.
116. Samuel D et al. Report of the monothematic EASL conference on liver transplantation for viral hepatitis (Paris, France, January 12-14, 2006). *J Hepatol* 2006;45:127-143.
117. Roche B et al. HBV DNA persistence 10 years after liver transplantation despite successful anti-HBVs passive immunoprophylaxis. *Hepatology* 2003;38:86-95.
118. Terrault NA et al. Prophylaxis in liver transplant recipients using a fixed dosing schedule of hepatitis B immunoglobulins. *Hepatology* 1996;24:1327-1333.
119. Lerut JP et al. Liver transplantation and HBsAg-positive postnecrotic cirrhosis: adequate immunoprophylaxis and delta virus co-infection as the significant determinants of long-term prognosis. *J Hepatol* 1999;30:706-714.
120. Blumhardt G et al. Liver transplantation in HBs antigen (HBsAg) carriers. *Transplant Proc* 1990;22:1577-1578.
121. Muller R et al. Liver transplantation in HBs antigen (HBsAg) carriers. Prevention of hepatitis B virus (HBV) recurrence by passive immunisation. *J Hepatol* 1991;13:90-96.
122. Lemmens HP et al. Outcome following orthotopic liver transplantation in HBsAg positive patients using short or long term immunoprophylaxis. *Transplant Proc* 1994;26:3622-3623.
123. Devlin J et al. Impact of immunoprophylaxis and patient selection on outcome of transplantation for HBsAg-positive liver recipients. *J Hepatol* 1994;21:204-210.

124. Konig V et al. Long-term follow up of hepatitis B virus infected recipients after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1994;58:553-559.
125. McGory RW et al. Improved outcome of orthotopic liver transplantation for chronic hepatitis B cirrhosis with aggressive passive immunization. *Transplantation* 1996;61:1358-1364.
126. Sawyer RG et al. Improved clinical outcome with liver transplantation for hepatitis B related cirrhosis. *Ann Surg* 1998;227:841-850.
127. Dickson R et al. Protective antibody levels and dose requirements for IV 5% Nabi Hepatitis B immune globulin combined with lamivudine in liver transplantation for hepatitis B-induced end stage liver disease. *Liver Transpl* 2006;12:124-133.
128. Nymann T et al. Prevention of hepatitis B recurrence with indefinite hepatitis B immune globulin (HBIg) prophylaxis after liver transplantation. *Clin Transplant* 1996;10:663-667.
129. Muller R et al. Eurohep consensus report on the management of liver transplantation for hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1994;21:1140-1143.
130. Jury of the International Consensus Conference on indications of liver transplantation. Consensus statement on indications for liver transplantation: Paris, June 22-23, 1993. *Hepatology* 1994;20:63S-68S.
131. Kim WR et al. Outcome of liver transplantation for hepatitis B in the United States. *Liver Transpl* 2004;10:968-974.
132. Steinmuller T et al. Increasing applicability of liver transplantation for patients with hepatitis B-related liver disease. *Hepatology* 2002;35:1528-1535.
133. Marzano A et al. Prevention of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation in cirrhotic patients treated with lamivudine and passive immunoprophylaxis. *J Hepatol* 2001;34:903-910.
134. Yao FY et al. Intramuscular hepatitis B immune globulin combined with lamivudine for prophylaxis against hepatitis B recurrence after liver transplantation. *Liver transplant Surg* 1999;5:491-496.

135. Yoshida EM et al. Liver transplantation for chronic hepatitis B infection with the use of combination lamivudine and low-dose hepatitis B immune globulin. *Liver Transplant Surg* 1999;5:520-525.
136. Angus PW et al. Combination low-dose hepatitis B immune globulin and lamivudine therapy provides effective prophylaxis against posttransplantation hepatitis B. *Liver Transplant* 2000;6:429-433.
137. Lee PH et al. Liver transplantation for patients with hepatitis B : prevention of hepatitis B recurrence by intravenous antihepatitis B immunoglobulin and lamivudine. *Transplant Proc* 2000;32:2245-2247.
138. McCaughan GW et al. Lamivudine therapy in patients undergoing liver transplantation for hepatitis B virus precore mutant-associated infection: high resistance rates in treatment of recurrence but universal prevention if used as prophylaxis with very low dose hepatitis B immune globulin. *Liver Transpl Surg* 1999;6:512-519.
139. Han SH et al. An efficacy and cost-effectiveness analysis of combination hepatitis B immune globulin and lamivudine to prevent recurrent hepatitis B after orthotopic liver transplantation compared with hepatitis B immune globulin monotherapy. *Liver Transplant* 2001;6:741-748.
140. Anselmo D et al. New era of liver transplantation of hepatitis B: a 17-year single-center experience. *Ann Surg* 2002;235:611-620.
141. Fontana R et al. Determinants of early mortality in patients with decompensated chronic hepatitis B treated with antiviral therapy. *Gastroenterology* 2002;123:719-727.
142. Marzano A et al. Viral load at the time of liver transplantation and risk of hepatitis B virus recurrence. *Liver Transpl* 2005;11:402-409.
143. Perrillo RP et al. A multicenter United States-Canadian trial to assess lamivudine monotherapy before and after transplantation for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;33:424-432.

144. Mutimer D et al. Lamivudine without HBIg for prevention of graft reinfection by hepatitis B : long-term follow up. *Transplantation* 2000;70:809-815.
145. Lo CM et al. Liver transplantation in asian patients with chronic hepatitis B using lamivudine prophylaxis. *Ann Surg* 2001;233:276-281.
146. Malkan G et al. Lamivudine for hepatitis B in liver transplantation. *Transplantation* 2000;69:1403-1407.
147. Mutimer D et al. High pre-treatment serum hepatitis B titre predicts failure of lamivudine prophylaxis and graft reinfection after liver transplantation. *J Hepatol* 1999;30:715-721.
148. Mutimer D et al. Outcome of lamivudine resistant hepatitis B virus infection in the liver transplant recipient. *Gut* 2000;46:107-113.
149. Naoumov NV et al. Randomized trial of lamivudine versus hepatitis B immunoglobulin for long-term prophylaxis of hepatitis B recurrence after liver transplantation. *J Hepatol* 2001;34:888-894.
150. Buti M et al. A randomized study comparing lamivudine monotherapy after a short course of hepatitis B immune globulin (HBIg) and lamivudine with long-term lamivudine plus HBIg in the prevention of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *J Hepatol* 2003;38:811-817.
151. Ottobrelli A et al. Patterns of hepatitis delta virus reinfection and disease in liver transplantation. *Gastroenterology* 1991;101:1649-1655.
152. Chalasani N et al. Is vaccination against hepatitis B infection indicated in patients waiting for or after orthotopic liver transplantation? *Liver Transpl Surg* 1998;4:128-132.
153. Han SH et al. Conversion from intravenous to intramuscular hepatitis B immune globulin in combination with lamivudine is safe and cost-effective in patients receiving long-term prophylaxis to prevent hepatitis B recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2003;9:182-187.
154. Keating G, Noble S. Recombinant hepatitis B vaccine (Engerix-B((R))): a review of its immunogenicity and protective efficacy against hepatitis B. *Drugs* 2003;63:1021-1051.

155. Young MD et al. Comparison of a triple antigen and a single antigen recombinant vaccine for adult hepatitis B vaccination. *J Med Virol* 2001;64:290-298.
156. Duclos P. Safety of immunisation and adverse events following vaccination against hepatitis B. *Expert Opin Drug Saf.* 2003;2:225-31.
157. Stark K et al. Immunizations in solid-organ transplant recipients. *Lancet* 2002;359:957-965.
158. Loniaz C et al. Hepatitis B vaccination results in 140 liver transplant recipients. *Hepatogastroenterology* 1997;44:135-138.
159. Feuerhake A et al. HBV-vaccination in recipients of kidney allografts. *Vaccine* 1984;2:255-256.
160. Rodby AR et al. Vaccination of the dialysis patient. *Semin Dial* 1991;4:102-105.
161. Wiedmann M et al. Decreased immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;31:320-324.
162. Dominguez M et al. Vaccination against hepatitis B virus in cirrhotic patients on liver transplant waiting list. *Liver Transpl* 2000;6:440-442.
163. Arslan M et al. Double-dose accelerated hepatitis B vaccine in patients with end-stage liver disease. *Liver Transpl* 2001;7:314-320.
164. Angelico M et al. Failure of a reinforced triple course of hepatitis B vaccination in patients transplanted for HBV-related cirrhosis. *Hepatology* 2002;35:176-181.
165. Sanchez-Fueyo A et al. Hepatitis B immuno globulin discontinuation followed by hepatitis B virus vaccination: a new strategy in the prophylaxis of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 2000;31:496-501.
166. Michel M-L, Mancini-Bourgine M. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Virol* 34 (suppl. 1) 2005;S108-S114.
167. De Maria N et al. Increased effective immunogenicity to high-dose and short-interval hepatitis B virus vaccination in individuals with chronic hepatitis without cirrhosis. *J Viral Hepat* 2001;372-376.

168. Vargas HE et al. A concise update on the status of liver transplantation for hepatitis B virus: the challenge in 2002. *Liver Transpl* 2002;8:2-9.
169. European Consensus Group on Hepatitis B Immunity. Are booster immunizations needed for lifelong hepatitis B immunity? *Lancet* 2000;355:561-65.
170. Di Paolo D et al. Extended HBV vaccination in liver transplant recipients for HBV-related cirrhosis: report of two successful cases. *Dig Liver Dis* 2005;37:793-798.
171. Pruett T. Vaccination for hepatitis B after transplantation: a realistic goal? *Hepatology* 2002;35:235-237.
172. Sanchez-Fueyo A, Martinez-Bauer E. Hepatitis B vaccination after liver transplantation. *Hepatology* 2002;36:257-259.
173. Wen YM et al. Enhanced immunogenicity in ice with hepatitis B vaccine complexed to human hepatitis B immunoglobulin. *Chin Med J* 1994;107:741-44.
174. McCluskie MJ et al. Immunization against hepatitis B virus by mucosal administration of antigen-antibody complexes. *Viral Immunol* 1998;11:245-52.
175. Wen YM et al. Antigen-antibody complex as therapeutic vaccine for viral hepatitis B. *Int Rev Immunol* 1999;18:251-8.
176. Wen YM et al. Hepatitis B vaccine and anti-HBs complex as approach for vaccine therapy. *Lancet* 1995;345:1575-6.
177. Di Paolo D et al. Extended double-dosage HBV vaccination after liver transplantation is ineffective, in the absence of lamivudine and prior wash-out of human hepatitis B immunoglobulins. *Dig Liver Dis* 2006;38:749-754.
178. Albeniz Arbizu E et al. Prophylaxis of recurrent hepatitis B virus by vaccination after liver transplant: preliminary results. *Transplant Proc* 2003;35:1848-9.
179. Lo CM et al. Failure of hepatitis B vaccination in patients receiving lamivudine prophylaxis after liver transplantation for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2005;43:283-7.
180. Lo CM et al. Development of antibody to hepatitis B surface antigen after liver transplantation for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2003;37:36-43.

181. Young MD et al. Adult hepatitis B vaccination using a novel triple antigen recombinant vaccine. *Hepatology* 2001;34:372-6.
182. Shapira MY et al. Rapid seroprotection against hepatitis B following the first dose of a Pre-S1/Pre-S2/S vaccine. *J Hepatol* 2001;34:123-7.
183. McDermott AB et al. Human leukocyte antigens influence the immune response to a pre-S/S hepatitis B vaccine. *Vaccine* 1999;17:330-339.
184. Karasu Z et al. HBV vaccination in liver transplant recipients: not an effective strategy in the prophylaxis of HBV recurrence. *J Viral Hepat* 2005;12:212-215.
185. Roy MJ et al. Induction of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccine. *Vaccine* 2000;19:764-778.
186. Putliz J et al. Cytotoxic T cell responses against hepatitis B virus polymerase induced by genetic immunization. *J Hepatol* 2000;33:986-991.
187. Bienzle U, Gunther M, Neuhans R, Vandepapeliere P, Vollmar J, Lun A, Neuhaus P. Immunization with an adjuvant hepatitis B vaccine after liver transplantation for hepatitis B-related disease. *Hepatology* 2003;38:811-819.
188. Gunther M et al. immunization with an adjuvant hepatitis B vaccine in liver transplant recipients: antibody decline and booster vaccination with conventional vaccine. *Liver Transpl* 2006;12:316-319.
189. Starkel P et al. Response to an experimental HBV vaccine permits withdrawal of HBIG prophylaxis in fulminant and selected chronic HBV-infected liver graft recipients. *Liver Transpl* 2005;11:1181-3.
190. Barcena M et al. Response to hepatitis B virus vaccine in patients transplanted for HBV-related disease under specific gammaglobulin prophylaxis. *Transplantation proceedings* 1999;31:2459-2460.

191. Rosenau J et al. Failure of hepatitis B vaccination with conventional HBsAg vaccine in patients with continuous HBIG prophylaxis after liver transplantation. *Liver Transpl* 2007;13:367-373.



**4. Pubblicazioni sotto forma di abstract, poster, lavoro per esteso e comunicazioni orali a convegni negli anni accademici di dottorato 2004/05, 2005/06, 2006/07**

***Pubblicazioni sotto forma di abstract***

1. PEGINTERFERON-ALPHA-2a PLUS ADEFOVIR VS. PEGINTERFERON-ALPHA-2a FOR 48 WEEKS IN HB<sub>e</sub>Ag-NEGATIVE CHRONIC HEPATITIS B: PRELIMINARY 24-WEEK RESULTS OF THE PEG FOR B RANDOMIZED MULTICENTER TRIAL  
Piccolo P, Lenci I, **Di Paolo D**, Telesca C, De Melia L, Sorbello O, Bandiera F, Piras MR, Antonucci G, Iacomi F, Nosotti L, Mari T, De Santis A, Cristofari F, Ponti ML, Angelico M.  
**Journal of Hepatology 2007;vol.46,suppl. 1,S26.**
  
2. COVALENTLY CLOSED CIRCULAR DNA (cccDNA) IN POST-TRANSPLANT LIVER BIOPSIES: A NEW TEST TO ASSESS THE PRESENCE OF THE VIRUS IN HBV TRANSPLANTED PATIENTS  
Angelico M, Lenci I, **Di Paolo D**, Lionetti R, Tariciotti L, De Luca L, Monaco A, Sforza D, Anselmo A, Perno CF, Tisone G.  
**Liver Transplantation 2007;vol.6,suppl. 1.,A560.**
  
3. ONE-YEAR EXTENDED ANTI-HBV VACCINATION WITH AN MPL-ADJUVANTED VACCINE COMBINED WITH ANTI-HBs IMMUNOGLOBULINS IN PATIENTS LIVER TRANSPLANTED FOR HBV-RELATED CIRRHOSIS  
**Di Paolo D**, Lenci I, Tisone G, Cerocchi C, Trinito MO, Berlanda M, Angelico M.  
**Digestive and Liver Disease 2007;vol.39,suppl. 10.,A29.**
  
4. COVALENTLY CLOSED CIRCULAR DNA (cccDNA) DETECTION IN POST-TRANSPLANT LIVER BIOPSIES: POSSIBLE EVALUATION OF HBIG PROPHYLAXIS WITHDRAWAL IN LOW-RISK TRANSPLANT RECIPIENTS  
Lenci I, Tisone G, **Di Paolo D**, Tariciotti L, Marcuccilli F, Perno CF, Angelico M.  
**Digestive and Liver Disease 2007;vol.39,suppl. 10.,A29.**

*Pubblicazioni sotto forma di poster*

1. ADEFOVIR-DIPIVOXIL IN THE TREATMENT OF LAMIVUDINE RESISTANT HBV-INFECTION BEFORE AND AFTER LIVER TRANSPLANTATION: A SINGLE CENTER EXPERIENCE  
Lenci I, **Di Paolo D**, Lionetti R, Petrolati A, Tisone G, Angelico M.  
**Digestive and Liver Disease 2004;vol. 36,suppl. n. 2,S269.**
  
2. LAMIVUDINE VERSUS ADEFOVIR-DIPIVOXIL IN THE TREATMENT OF PRE-CORE MUTANT HBV INFECTION: WHICH SHOULD BE USED FIRST?  
**Di Paolo D**, Lenci I, Lionetti R, Petrolati A, Tisone G, Angelico M.  
**Digestive and Liver Disease 2004;vol. 36,suppl. 2,S240.**
  
3. PEG-INTERFERON A-2A (40 KD) WITH OR WITHOUT RIBAVIRIN IN THE TREATMENT OF NAÏVE PATIENTS WITH RECURRENT HEPATITIS C AFTER LIVER TRANSPLANTATION  
Petrolati A, Lionetti R, Lenci I, **Di Paolo D**, Donato D, Merli M, Angeli P, Burra P, Strazzabosco M, Tisone G, Angelico M.  
**Hepatology 2005;vol.4, suppl. 1,482A.**
  
4. CHRONIC HEPATITIS B VIRUS INFECTION AND DISEASE IN CENTRAL ITALY: CROSS-SECTIONAL AND 6-MONTH PROSPECTIVE DATA OF THE HEP B FREE OBSERVATIONAL STUDY  
Piccolo P, Telesca C, Lenci I, **Di Paolo D**, Angelico M.  
**Hepatology 2005;Vol.4, suppl. 1,482A.**
  
5. COVALENTLY CLOSE CIRCULAR DNA (cccDNA) IN POST-TRANSPLANT LIVER BIOPSIES: A NEW TOOL TO ASSESS THE NEED OF CONTINUOUS PROPHYLAXIS AGAINST HBV RECURRENCE  
Lenci I, **Di Paolo D**, Tisone G, Marcuccilli F, Ciotti M, Guenci T, Perno CF, Angelico M.  
**Journal of Hepatology 2007;vol.46,suppl. 1,S72**
  
6. LONG-TERM RESULTS OF A RANDOMIZED TRIAL ON IMMUNOSUPPRESSION WITH TRANSPLANT IN HUMAN  
Angelico M, Baiocchi L, Lenci I, **Di Paolo D**, Tariciotti L, Monaco A, Anselmo A, Tisone G  
**Liver Transplantation 2007;vol.13,suppl. 1.,67A.**

7. EARLY AND LATE ADHERENCE TO STANDARD DUAL THERAPY (PEGINTERFERON-ALFA+RIBAVIRIN) IN NAÏVE PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C: A REAL WORLD EVALUATION  
Lenci I, Francioso S, **Di Paolo D**, Lionetti R, Piccolo P, Angelico M.  
**Digestive and Liver Disease 2007;vol.39,suppl. 10.,A29.**
  
8. METABOLIC SYNDROME AND LIVER TRANSPLANTATION: INCIDENCE AND RISK FACTORS  
Francioso S, Lenci I, Almerighi C, Angelico F, **Di Paolo D**, Tisone G, Angelico M.  
**Digestive and Liver Disease 2007;vol.39,suppl. 10.,A40.**
  
9. INTRAHEPATIC COVALENTLY CLOSED CIRCULAR DNA (CCCDNA) DETECTION IN PATIENTS TRANSPLANTED FOR HBV-RELATED CIRRHOSIS: A TOOL TO JUDGE FOR HBIG PROPHYLAXIS WITHDRAWAL IN LOW-RISK TRANSPLANT RECIPIENTS.  
Lenci I, Tisone G, Ciotti M, **Di Paolo D**, Tariciotti L, Marcuccilli F, Perno CF, Angelico M.  
**Hepatology 2007;vol.46,suppl. 4,A469.**

***Pubblicazioni sotto forma di lavoro per esteso***

1. EXTENDED HBV VACCINATION IN LIVER TRANSPLANT RECIPIENTS FOR HBV-RELATED CIRRHOSIS: REPORT OF TWO SUCCESSFUL CASES  
**Di Paolo D**, Lenci I, Trinito MO, Tisone G, Angelico M.  
**Digestive and Liver Disease 2005;37(10):793-798.**
  
2. ASSEMBLY OF BILIARY LIPIDS IN NATIVE HEPATIC BILE AFTER ORTHOTOPIC LIVER TRANSPLANTATION: A BIOCHEMICAL AND ULTRA-STRUCTURAL STUDY IN HUMANS  
Baiocchi L, Tisone G, Falasca L, Telesca C, **Di Paolo D**, Orlando G, Furfaro S, Anselmo A, Carbone M, Angelico M.  
**Hepatology Research 2006;35(3):215-221.**
  
3. EXTENDED DOUBLE-DOSAGE HBV VACCINATION AFTER LIVER TRANSPLANTATION IS INEFFECTIVE, IN THE ABSENCE OF LAMIVUDINE AND PRIOR WASH-OUT OF HUMAN HEPATITIS B IMMUNOGLOBULINS

**Di Paolo D**, Lenci I, Trinito MO, Carbone M, Longhi C, Tisone G, Angelico M.  
**Digestive and Liver Disease 2006;38(10):749-754.**

4. RECURRENT MYOCARDIAL ISCHEMIA DURING COMBINATION ANTIVIRAL THERAPY IN A PATIENT WITH CHRONIC HEPATITIS C AND NORMAL AMINOTRANSFERASE LEVELS

Lenci I, Piccolo P, Francioso S, **Di Paolo D**, Galante A, Angelico M.  
**Digestive and Liver Disease 2007; in press.**

*Comunicazioni orali a convegni*

**Giugno 2005** presso il XVIII Congresso Nazionale SPIGC (Società Polispecialistica Italiana dei giovani Chirurghi) a Roma (15-17/06/2005):

- “REINFORCED ANTI-HBV VACCINATION WITHOUT LAMIVUDINE AND PRIOR HBIG WASH-OUT TO PREVENT HBV REINFECTION AFTER LIVER TRANSPLANTATION IN LOW RISK HBV RECURRENCE TRANSPLANT RECIPIENTS”

**Ottobre 2007** presso la Riunione Monotematica A.I.S.F. (Associazione Italiana Studio Fegato) a Bergamo (10-12/10/2007):

- “ONE-YEAR EXTENDED ANTI-HBV VACCINATION WITH AN MPL-ADJUVANTED VACCINE COMBINED WITH ANTI-HBs IMMUNOGLOBULINS IN PATIENTS LIVER TRANSPLANTED FOR HBV-RELATED CIRRHOSIS”.