

UNIVERSITA' DI PISA



DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

**Corso di Laurea Magistrale in Biologia applicata alla
Biomedicina**

Tesi di Laurea:

**“ANALISI DELLE FRAZIONI PLASMATICHE DELLA
GAMMA-GLUTAMMILTRANSFERASI (GGT) IN
DONATORI DI SANGUE REATTIVI AI TEST DI
SCREENING PER L'EPATITE B e C”**

Candidata:

Annalisa Landi

Relatori:

Prof. Aldo Paolicchi

Dott.ssa Rosaria Bonini

Anno Accademico 2012/2013

Ai miei genitori

Indice

Riassunto	I
Abstract	VI
1. Introduzione	1
1.1 Le malattie trasmesse con la trasfusione.....	1
1.2 L'epatite.....	1
1.3 Le manifestazioni cliniche dell'epatite.....	3
1.4 L'epatite B.....	3
1.4.1 Il virus.....	3
1.4.2 Modalità di trasmissione.....	4
1.4.3 Caratteristiche cliniche.....	4
1.5 L'epatite C.....	6
1.5.1 Il virus.....	6
1.5.2 Modalità di trasmissione.....	8
1.5.3 Caratteristiche cliniche.....	10
1.6 I portatori cronici di HBV.....	12
1.7 I portatori cronici di HCV.....	13
1.8 I marcatori di infezione virale.....	14
1.9 Obblighi di legge sulle donazioni.....	20
1.10 I campioni negativi, positivi e reattivi.....	24
1.11 La gamma-glutamyltransferasi (GGT).....	24
1.11.1 Meccanismo d'azione della GGT e misura della sua attività.....	26
1.11.2 Funzioni fisiologiche.....	28
1.11.3 Significato diagnostico della GGT totale sierica.....	31
1.12 Origine e caratteristiche della GGT sierica e delle frazioni della GGT.....	38
1.12.1 Metodi per la misura delle forme molecolari della GGT.....	38
1.12.2 Caratteristiche chimico-fisiche della GGT sierica e delle frazioni GGT.....	41
1.13 GGT totale e frazioni nel danno epatico.....	46
2. Scopo della tesi	48

3. Materiali e metodi	50
3.1 Raccolta dei campioni	50
3.1.1 Criteri di classificazione.....	50
3.2 Test utilizzati.....	51
3.2.1 Test di screening sierologico	51
3.2.1.1 Il metodo per l'HBsAg.....	52
3.2.1.2 Il metodo per gli anti-HCV	55
3.2.1.3 I metodi NAT(<i>Nucleic Acid Testing</i>).....	58
3.2.2 I test di conferma	60
3.2.2.1 Il test INNO-LIA HCV Score	60
3.2.2.2 Il pannello per l'HBV	64
3.2.3 La cromatografia per esclusione molecolare.....	70
3.2.3.1 I reagenti	71
3.2.3.2 Determinazione delle frazioni plasmatiche di GGT	71
3.2.3.3 Quantificazione delle frazioni di GGT	75
3.3 Statistica.....	75
4. Risultati e discussione	78
4.1 Descrizione della popolazione: le variabili cliniche	78
4.2 Descrizione della popolazione: le frazioni di GGT	83
4.3 Analisi di correlazione nel gruppo dei Positivi.....	95
4.4 Il gruppo dei Positivi: analisi statistiche tra il sottogruppo con viremia zero e il sottogruppo con viremia positiva	96
4.5 Analisi ROC.....	98
5. Conclusioni	101
6. Bibliografia	103
Ringraziamenti	107

RIASSUNTO

Questa tesi sperimentale si inserisce in un progetto di ricerca finalizzato allo studio delle variazioni dell'espressione delle frazioni dell'enzima gamma-glutamyltransferasi sierica (GGT) in soggetti donatori di sangue risultati *positivi* ai test di screening per HBsAg e/o HCVAb a cui i donatori sono abitualmente sottoposti ogni qual volta che effettuano una donazione. Affinché la donazione possa essere considerata valida, il donatore, in base alla normativa vigente in Italia, deve risultare *negativo* ai test di screening per le malattie infettive, tra cui il test per l'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg) e il test per valutare la presenza di anticorpi contro il virus dell'epatite C (anti-HCV). Può accadere che il donatore risulti positivo a tali test, pur essendo negativi i test che valutano la presenza di DNA o RNA virale (test NAT) e i test di conferma per l'HBV e l'HCV applicati in caso di reattività/positività iniziale al test di screening; in questo caso le unità di sangue ed emocomponenti provenienti da tali donatori non possono essere utilizzate a fini medici e vengono eliminate nonostante il donatore non possa considerarsi affetto da epatite B o C. Ci si trova così di fronte ad un problema di gestione di tali donatori e delle relative donazioni di sangue.

La GGT è utilizzata come marcatore di danno epatico dal 1961; il test per la valutazione della GGT è molto sensibile ma al tempo stesso poco specifico, perciò è difficile associare l'elevazione della GGT a una specifica causa patologica. Le frazioni della GGT, invece, sono biomarcatori più specifici per determinate patologie epatiche, infatti, la frazione b-GGT è associata a steatosi epatica non alcolica e la frazione s-GGT ad epatite virale cronica di tipo

C; Il rapporto tra queste due frazioni è perciò utile per la diagnosi differenziale tra questi due gruppi di patologie epatiche. La valutazione delle frazioni plasmatiche della GGT assume, quindi, un significato diagnostico maggiore rispetto alla semplice valutazione della GGT totale. La valutazione delle frazioni di GGT è stata effettuata utilizzando una cromatografia per esclusione molecolare associata all'iniezione post-colonna di un substrato fluorescente specifico per l'enzima GGT. La cromatografia e le condizioni della reazione post-colonna permettono di individuare e quantificare nel plasma, in modo selettivo e sensibile, quattro frazioni di GGT, delle quali tre sono complessi ad alto peso molecolare, b- GGT (PM=2000 kDa), m-GGT (PM=1000 kDa), s-GGT (PM=250 kDa) e una quarta frazione, f-GGT (PM=70 kDa) con un peso molecolare compatibile con l'enzima libero.

Lo scopo di questa tesi è valutare se i donatori positivi ai test di screening iniziali per l'epatite B e C (gruppo *Reattivi*) presentino frazioni di GGT significativamente diverse rispetto ai donatori con risultato *negativo* ai test di cui sopra (gruppo *Controllo*) e, se ci siano differenze significative anche con un gruppo di pazienti (gruppo *Positivi*) che, invece, sono realmente positivi ai test NAT per la presenza di genoma virale e/o al test per la ricerca di anticorpi contro il virus.

Analizzando i dati ottenuti dalle analisi cromatografiche, emerge che non tutte e quattro le frazioni della GGT sono significativamente diverse nei tre gruppi oggetto dello studio: le frazioni b-GGT ed f-GGT, infatti, non presentano differenze significative all'analisi statistica. Le variabili GGT Totale, m-GGT, s-GGT ed il rapporto b-GGT/s-GGT, invece, sono risultate significativamente diverse nei tre gruppi (statistica Kruskal-Wallis) e, in particolare, il test per il confronto multiplo (Test di Dunn) ha mostrato differenze nel confronto Positivi vs Controlli

e Positivi vs Reattivi mentre non ci sono differenze quando confrontiamo il gruppo dei Controlli con il gruppo dei Reattivi (Controlli vs Reattivi).

La GGT totale ha mostrato valori statisticamente più elevati nel gruppo dei Positivi rispetto ai Controlli e ai Reattivi (Positivi vs Controlli; Positivi vs Reattivi; $p < 0.05$). La frazione m-GGT mostra nel gruppo dei Positivi valori significativamente più elevati rispetto agli altri due gruppi e, situazione analoga, si può osservare anche per la frazione s-GGT. In questo caso il gruppo Positivi ha valori di mediana e 25°-75° percentile nettamente superiori rispetto ai valori riscontrati negli altri due gruppi [Positivi: 14,9 (6,1 – 27,5); Controlli: 4,7 (2,4 – 6,9); Reattivi: 3,5 (2,2 – 9,1)] Tale dato è in accordo con l'ipotesi che la frazione s-GGT sia un indice specifico di danno epatocellulare, come verificato in pazienti HCV. Essendo la frazione s-GGT più elevata nel gruppo dei Positivi, è chiaro che il rapporto b-GGT/s-GGT vada invece a ridursi in questo gruppo. E' interessante notare che il 75% dei positivi ha valori del rapporto b-GGT/s-GGT più bassi del valore di 25° percentile del gruppo Controllo e del gruppo Reattivi.

Altra variabile presa in considerazione è il volume di eluizione il quale può essere considerato come un marcatore surrogato della variabilità delle frazioni in termini di composizione/qualità; il volume di eluizione dipende dalla massa molecolare (in questo caso della GGT) e presenta per le frazioni b-GGT ed f-GGT un coefficiente di variazione inferiore rispetto a quello delle frazioni m- ed s-GGT. (C.V. b-GGT=1,4%; C.V. f-GGT=0,8%; C.V. m-GGT= 3%; C.V. s-GGT= 1,9%). E' stato valutato il volume di eluizione della frazione s-GGT e, per ridurre la variabilità inter-cromatogramma, è stata considerata la differenza tra i volumi di eluizione di f-GGT ed s-GGT e non il valore assoluto della frazione s-GGT; l'analisi statistica non ha però riscontrato differenze significative tra i tre gruppi per quanto riguarda la

variabile Vol. el.(f-GGT – s-GGT) e questo ci porta a dire che l'epatite HCV non sembra essere associata alla produzione di una frazione s-GGT con composizione diversa rispetto a quella presente nei soggetti sani.

Le analisi statistiche di correlazione tra la variabile Viremia e i principali marcatori di danno epatico (ALT; AST e GGT Tot) e le varie frazioni della GGT hanno mostrato una correlazione positiva con ALT, AST e GGT Tot; la frazione b-GGT non ha mostrato una correlazione significativa con la viremia, a conferma dei dati presenti in letteratura che vedono la b-GGT, non associata a danno epatico ma piuttosto ad alterazioni dello stato metabolico degli epatociti; tra le altre frazioni la viremia correla principalmente, in senso positivo, con la s-GGT e, in senso negativo con il rapporto b-GGT/s-GGT. Tali risultati sono in accordo con i dati di letteratura che vedono in elevati valori di s-GGT un indice di danno epatocellulare.

La suddivisione del gruppo dei Positivi in due sottogruppi, l'uno costituito dai pazienti con Viremia zero (n=14) e l'altro costituito da pazienti con viremia positiva (n=29) è servita a valutare se la replicazione virale vada o meno ad incidere sul profilo di attività delle varie frazioni; all'analisi statistica tutte le variabili sono risultate significativamente più elevate nel sottogruppo viremia positiva rispetto al sottogruppo viremia zero; in particolare la frazione s-GGT risulta nettamente più elevata nei pazienti con replicazione virale in atto, di nuovo in accordo con i dati di letteratura e di questa tesi che indicano la frazione s-GGT un importante indice di danno epatocellulare. Il rapporto b-GGT/s-GGT risulta, di conseguenza, significativamente più basso nel sottogruppo viremia positiva.

Confrontando le variabili di cui sopra tra il gruppo Controllo e il sottogruppo Viremia zero, paragonabili dal punto di vista della replicazione virale, emerge che tutte le variabili analizzate non mostrano differenze significative tra i due gruppi tranne il rapporto b-GGT/s-

GGT che risulta significativamente più basso nel sottogruppo Viremia zero rispetto al gruppo Controllo. Questo dato fa ipotizzare che il fatto di essere venuti a contatto con il virus HCV, lasci alterazioni permanenti al tessuto epatico; una sorta di "impronta" che fa sì che nel tempo persistano differenze nell'attività delle frazioni di GGT e, quindi, del rapporto b-GGT/s-GGT.

L'analisi delle curve ROC ha valutato la capacità di GGT Tot, s-GGT e rapporto b/s-GGT di distinguere l'uno dall'altro i soggetti Controllo, Reattivi e Positivi. Nessuna delle tre variabili mi permette di distinguere i Controlli dai Reattivi mentre il rapporto b/s-GGT è la variabile che mi permette la migliore discriminazione dei soggetti Positivi all'HCV rispetto agli altri due gruppi, presentando il valore più elevato di area sottesa alla curva.

Concludendo, da questo lavoro di tesi, è emerso che l'analisi delle frazioni di GGT ha un significato diagnostico maggiore rispetto alla GGT totale e che il valore del rapporto b-GGT/s-GGT risulta essere l'indice più sensibile di un'alterazione del tessuto epatico in corso di epatopatia virale.

I dati emersi hanno confermato quelli presenti in letteratura e l'analisi delle frazioni GGT è servita ad escludere come causa delle reattività iniziale al test del gruppo dei Reattivi un'infezione subclinica che, se presente, sarebbe stata messa in evidenza da una diversa distribuzione delle frazioni e del rapporto b-GGT/s-GGT. Escludendo l'infezione subclinica, la causa della reattività potrebbe essere la presenza in circolo di un interferente di altra natura.

ABSTRACT

This study is part of a research project aimed to analyse the variations of the expression of serum γ -glutamyltransferase (GGT) fractions in blood donors who resulted *positive* to HBsAg and/or HCV-Ab screening tests, which are carried out at each blood donation. On the basis of the Italian regulations, a blood bag is suitable for donation only if the donor is *negative* to viral screening test, including that looking for the presence for hepatitis B virus antigen (HBsAg) and the presence of antibodies against hepatitis C virus (anti-HCV).

Some donor may result positive to screening test, but negative to the presence of viral DNA or RNA (NAT tests) and confirmatory test for HBV and HCV; in this case the blood unit and derived components must be eliminated even if the donor can not be considered infected with hepatitis B or C.

Circulating GGT levels are used as a marker of liver injury since 1961, it is a sensitive but not specific test. On the other hand fractional GGT analysis provided more specific biomarkers for some liver diseases, for example, b-GGT fraction is associated with non-alcoholic fatty liver disease, while s-GGT is associated with chronic viral hepatitis C, thus the b-GGT/s-GGT resulted to be the best variable for the differential diagnosis. Fractional GGT analysis is performed by a molecular exclusion chromatography associated with the post-column injection of a fluorescent substrate specific for the GGT enzyme. This method allows the detection and quantification of four plasma GGT fractions, three of which are high molecular weight complexes (b- GGT 2000 kDa, m-GGT 1000 kDa, s-GGT 250 kDa), while the fourth fraction (f-GGT 70 kDa) is constituted by the free enzyme.

The aim of this study is to analyse and compare GGT fractions levels in blood donors positive (Reactive group) or negative (*Control group*) to the screening tests for HBV and HCV, and patients (*Positive group*) infected by HCV virus which are positive to NAT test and/or to antibodies against the virus.

The data obtained by chromatographic analysis showed that total GGT, m-GGT, s-GGT and b-GGT/s-GGT ratio are significantly different in the three groups (Kruskal-Wallis test), and the multiple comparison test (Dunn Test) showed differences between the Positive and both the Control and Reactive groups, while there were no differences between Control and Reactive groups.

Total GGT showed statistically higher values in the Positive group when compared to Control and Reactive groups ($p < 0.05$). m-GGT and s-GGT fraction showed significant higher values in Positive group than in the other two. In particular, s-GGT median and 25°-75° percentiles values in Positive group were significantly higher the values found in other two groups [Positive: 14,9 (6,1 – 27,5); Control: 4,7 (2,4 – 6,9); Reactive: 3,5 (2,2 – 9,1)]. This finding is in agreement with the hypothesis that s-GGT fraction is a specific index of hepatocellular damage, as occur in HCV patients. Being the s-GGT fraction higher in Positive group, the b-GGT/s-GGT ratio showed the lowest values in this group; it's interesting to observe that the b-GGT/s-GGT 75th percentile in the Positive group was values lower than the 25° percentile both of the Control and Reactive groups.

I considered also the elution volume as analytical variable, being a surrogate marker of the fraction variability in terms of composition/quality; the elution volume, in fact, depends on the molecular mass. Elution volume of b-GGT and f-GGT fractions showed lower coefficient of variations than those of m-GGT and s-GGT fractions (b-GGT CV = 1.4%, CV = 0.8% f-GGT,

m-GGT CV = 3%, s-GGT CV = 1.9%). In order to reduce the inter-chromatogram variability, I calculated the difference between the elution volumes of f-GGT and s-GGT. Statistical analysis did not show a significant difference among the three groups for this variable, thus I can hypothesise that HCV infection is not associated with the production of s-GGT fraction with different composition compared to that present in healthy subjects.

The statistical correlation analysis shows a positive correlation between viraemia values and the main liver injury markers (ALT, AST and total GGT); regarding fractional GGT, b-GGT did not show any correlation with viraemia levels, the other three fractions were positively while the b-GGT/s-GGT ratio was negatively correlated with viraemia. These data agree with the literature data that suggest b-GGT fraction as a marker of metabolic state of hepatocytes and s-GGT as a marker of hepatocellular damage.

Patients of the Positive group were divided in two subgroups, according to the absence ("Viraemia zero", n = 14) or presence ("Positive Viraemia", n = 29) of circulating HCV RNA, to assess if viral replication affects fractional GGT activity. All GGT fractions were significantly higher in "Positive Viraemia" than in "Viraemia Zero" subgroup; in particular s-GGT fraction is significantly higher in patients with on-going viral replication, again in agreement with literature data and with this study, which indicate s-GGT fraction as an important index of hepatocellular damage. Accordingly, the b-GGT/s-GGT ratio is significantly lower in the "Positive Viraemia" subgroup.

The comparison of fraction GGT activity between the Control group and "Viraemia Zero" subgroup showed that there were any differences except for the b-GGT/s-GGT ratio which was significantly lower in the "Viraemia zero" subgroup. This finding suggests that the HCV infection leaves permanent alterations to liver tissue that are marked by the b-GGT/s-GGT

ratio.

value.

The ROC curve analysis evaluated the ability of Total GGT, s-GGT and b-GGT/s-GGT ratio to discriminate between Control, Reactive and Positive subjects. None of the three variables distinguished the Controls from the Reactives, while the b-GGT /s-GGT ratio, presenting the highest value of the area under the curve, allowed the best discrimination of HCV positive subjects from the other two groups.

In conclusion, fractional GGT analysis has a greater diagnostic power than total GGT analysis and that the b-GGT/s-GGT ratio value appears to be the most sensitive index of a liver tissue alteration during a viral liver disease. Data confirm those reported in literature and the GGT fraction analysis helped us to exclude a subclinical infection in the Reactive group, as a possible cause of reactivity to the screening test.

1. INTRODUZIONE

1.1 Le malattie trasmesse con la trasfusione

Sono stati realizzati molti progressi negli esami del sangue per la diagnosi delle malattie trasmissibili con le donazioni di sangue. Tuttavia, il rischio della trasmissione di patologie virali, batteriche e parassitarie esiste ancora e nuovi agenti patogeni possono comparire in ogni momento. Per questo, le complicanze infettive della trasfusione restano un importante argomento di attenzione per la Medicina Trasfusionale.

1.2 L'epatite

L'epatite è un'inflammatione del fegato che può essere causata da numerose tossine, da processi immunologici oppure da agenti infettivi. L'epatite correlata alla trasfusione è quasi esclusivamente determinata da virus. Questi virus comprendono quelli classificati dall'epatite A fino alla E (HAV, HBV, HCV, HDV, HEV), il citomegalovirus (CMV), il virus di Epstein-Barr (EBV) e nuovi virus recentemente descritti come possibili responsabili di epatite (come il TTV e il SEN-V). Gli agenti infettivi costituiscono una seria minaccia per i riceventi, se persistono nel circolo di donatori di sangue asintomatici, e sono in grado di causare in essi malattie acute o croniche di rilevanza clinica. Nel passato la maggior parte delle epatiti post-trasfusionali era attribuibile ai virus HBV e HCV, entrambi in grado di determinare nei donatori un quadro stabile di portatore caratterizzato da un elevato titolo viremico in assenza dei sintomi clinici. I virus HBV ed HCV sono anche responsabili della morbilità epatica a lungo termine e della connessa mortalità. L'HAV e l'HEV sono virus che vengono trasmessi

per via gastro-enterica e circolano transitoriamente nel sangue durante la fase acuta dell'infezione. Poiché il soggetto viremico di solito è clinicamente ammalato, e non è quindi un candidato per la donazione, gli HAV e gli HEV non costituiscono una seria minaccia per i riceventi. Tuttavia, la viremia da HAV può essere presente fino a 28 giorni prima dello sviluppo della sintomatologia: casi isolati di trasmissione virale sono stati segnalati a seguito di trasfusione di emocomponenti cellulari e di concentrati di Fattore VIII. Poiché manca di un involucro lipidico l'HAV, non viene inattivato dal trattamento con solventi/detergenti; per questo sono in corso di sviluppo ulteriori metodi di inattivazione per prevenire la ricorrenza di questi episodi. L'HEV è raro negli Stati Uniti e nessun caso di trasmissione del virus correlata alla trasfusione vi è mai stato documentato. L'HDV, indicato come agente delta, può causare infezioni e gravi epatiti a seguito di trasfusioni o di altro tipo di esposizioni parenterali. Tuttavia, poiché l'HDV è un virus difettivo rilevato solo nei portatori di HBV, lo screening dei donatori per l'infezione da HBV elimina simultaneamente il rischio per l'HDV. L'HGV, detto anche GBV-C, è lontanamente imparentato con l'HCV e ha un'ampia diffusione (>1%) tra i donatori asintomatici. L'HGV è inequivocabilmente trasmissibile con la trasfusione, ma non è mai stata stabilita una relazione causale tra HGV ed epatite o altre manifestazioni di malattia, nonostante ampi studi condotti in merito. Il TTV appare simile all'HGV per frequenza, trasmissibilità e assenza di rilevanza clinica. Per questo motivo, lo screening dei donatori di sangue per HGV o TTV non viene raccomandato correntemente. L'epatite associata al CMV o all'EBV è di solito moderata, senza quadri severi di immunosoppressione. La frequenza e la gravità di queste epatiti non giustifica quindi l'adozione routinaria di misure di screening. Il SEN-V appare lontanamente simile al TTV e appartiene ad una famiglia di piccoli virus con DNA circolare che vengono indicati come

Circoviridae. Lo screening per questi agenti non viene correntemente raccomandato perché non sono state accertate associazioni con quadri patologici. (1)

1.3 Le manifestazioni cliniche dell'epatite

La maggior parte degli individui che contraggono un'infezione da HBV o HCV presentano un'infezione primaria subclinica senza chiari sintomi o evidenza di malattia. Altri sviluppano un'epatite evidente con ittero, nausea, vomito, disturbi addominali, faticabilità, urine scure ed aumento degli enzimi epatici. I segni ed i sintomi di solito regrediscono spontaneamente. L'epatite acuta di tipo C tende ad essere più moderata di quella di tipo B. Sporadicamente il decorso clinico dell'HBV, e più raramente quello delle infezioni da HCV, può essere complicato da un'epatite fulminante. Più frequente è la tendenza dell'epatite C ad evolvere in epatite cronica (dal 75% all'85% degli individui affetti), con un numero significativo di casi che evidenziano una progressione a lungo termine verso la cirrosi, l'insufficienza epatica o il carcinoma epatocellulare. L'epatite A tende ad essere clinicamente moderata in soggetti altrimenti in buona salute e non è nota per progredire verso l'epatite cronica o uno stato di portatore cronico. L'infezione HEV può determinare una malattia severa nelle donne in gravidanza. La vaccinazione è disponibile per l'epatite di tipo A e per l'epatite B. (1)

1.4 L'epatite B

1.4.1 Il virus:

L'epatite B è una malattia infettiva che colpisce 350 milioni di pazienti. Il virus dell'epatite B appartiene alla famiglia Hepadnaviridae. Il virus ha un DNA parzialmente a doppio filamento con antigene core (HBcAg) circondato da un guscio contenente l'antigene di superficie

(HBsAg). Il genoma del virus dell'epatite B (HBV) è costituito da 3200 nucleotidi e il virus utilizza efficientemente la sua informazione genetica per codificare quattro gruppi di proteine e i loro elementi regolatori spostando i quadri di lettura sopra lo stesso materiale genetico. La risposta immunitaria contro HBsAg fornisce l'immunità contro HBV; gli anticorpi contro HBcAg indicano infezione, IgM-anti HBc indicano un'infezione recente e di solito scompaiono entro sei mesi mentre IgG-anti HBc persiste per tutta la vita ed indica un'infezione pregressa. Gli anticorpi contro HBsAg (anti-HBs) compaiono dopo l'eliminazione dei HBsAg o dopo l'immunizzazione. La presenza di HBsAg per più di sei mesi è definito come infezione cronica da HBV.

1.4.2 Modalità di trasmissione:

HBV si trasmette per via parenterale attraverso il sangue contaminato o altri liquidi biologici attraverso i vasi sanguigni, la pelle o le mucose. Il virus può essere rilevato in tutti i fluidi del corpo umano anche se la concentrazione del virus è massima nel sangue ed è invece relativamente bassa nella saliva, nello sperma e nei liquidi vaginali. Pertanto, non vi è quasi nessun rischio di trasmissione nel corso della vita quotidiana, e l'infezione attraverso la trasmissione fecale-orale non si verifica. Le vie di trasmissione principali comprendono l'infezione perinatale, le infezioni della cute e delle mucose causate da sangue infetto o altri fluidi corporei (trasfusioni di sangue, uso di siringhe contaminate, emodialisi, test invasivi o intervento chirurgico), e i contatti sessuali. (2)

1.4.3 Caratteristiche cliniche:

L'epatite B presenta manifestazioni cliniche che vanno da portatori asintomatici di HBV ad insufficienza epatica fulminante. L'epatite diventa cronica e, da qui, spesso si progredisce

verso la cirrosi e il carcinoma epatocellulare. Tali manifestazioni cliniche possono variare a seconda dell'età del paziente al momento dell'infezione: meno del 10% dei bambini sotto i 5 anni mostra sintomi, mentre essi sono presenti nel 30-50% degli adulti. Il rischio di infezione cronica da HBV varia inversamente con l'età: dall'80 al 90% per le infezioni neonatali, dal 30 al 60% nei bambini, 5% o meno per gli adulti. La maggior parte dei casi di trasmissione verticale da madre a figlio progredisce verso l'instaurarsi di portatori cronici. Il periodo di incubazione per l'insorgenza di epatite acuta B è di 3-4 mesi, con sintomi prodromici quali affaticamento, febbre e anoressia. Sintomi come dolori articolari ed eruzioni cutanee sono stati osservati in circa il 10% dei pazienti. L'ittero si verifica 1 o 2 settimane dopo la comparsa dei sintomi, ed i sintomi clinici migliorano, nella maggior parte dei casi, entro 3 mesi. L'epatite fulminante, accompagnata da encefalopatia epatica, si ritrova nello 0,5% dei casi di pazienti adulti. Nella maggior parte dei casi di epatite B acuta, HBsAg scompare entro 6 mesi e la funzione del fegato viene recuperata. Quando il virus persiste per oltre 6 mesi, lo stato acuto si trasforma in uno stato cronico. L'epatite cronica B è caratterizzata dalla risposta immunitaria e dalla continua replicazione virale. La fase iniziale delle infezioni perinatali acquisite è caratterizzata da elevati livelli di replicazione virale senza evidenza di malattia epatica attiva con livelli normali di transaminasi dovuti alla tolleranza immunitaria. La seconda fase dell'infezione perinatale acquisita cronica, fase di sgombero immunitario, è caratterizzata da livelli elevati di replicazione virale con danno epatico attivo. La fibrosi del fegato può progredire durante questa fase e può portare a cirrosi. Durante la fase di sgombero immunitario, la riduzione del livello di HBV DNA può portare all'instaurarsi di uno stato di "portatore inattivo HBV" con bassa carica virale e funzione epatica normale. Alcuni pazienti mostrano aumenti ripetuti dei livelli di virus e

necroinfiammazione che progredisce in cirrosi o cancro del fegato nel lungo periodo di tempo. Il decorso clinico dell'epatite B è determinato dall'interazione tra lo stato della replicazione virale e la risposta immunitaria dell'ospite. Il tutto può essere aggravato da fattori come l'alcol e la coinfezione con altri virus. Il rischio di progressione della malattia epatica o l'incidenza di cancro al fegato aumenta con un elevato stato di replicazione virale e questo rischio è maggiore nei pazienti con cirrosi. E' noto che il rischio di cancro al fegato è ulteriormente aumentato in pazienti con età avanzata, storia familiare di cancro al fegato o cirrosi, alcool e coinfezione da virus dell'epatite C. (2)

1.5 L'epatite C

1.5.1 Il virus:

Il virus dell'epatite C (HCV) colpisce 170 milioni di persone in tutto il mondo. L'HCV causa gravi disturbi epatici che vanno dall'epatite cronica alla cirrosi fino al carcinoma epatocellulare. Le patologie epatiche correlate all'HCV sono responsabili, negli Stati Uniti, di 12.000 morti ogni anno. Contrariamente alla maggior parte delle altre infezioni virali, il segno distintivo dell'infezione virale da HCV è che la maggior parte dei pazienti sviluppa infezione cronica dopo l'esposizione virale. Purtroppo, nessun vaccino efficace è disponibile per HCV. HCV è stato isolato per la prima volta nel 1989. Si tratta di un RNA virus con un genoma di 9,6 kb. Il virus è classificato come appartenente al genere Hepacivirus nella famiglia Flaviviridae. Sebbene l'RNA virale sia stato rilevato nel siero, nella milza e nei linfonodi di pazienti infetti, varie evidenze supportano l'idea che HCV sia un virus epatotropo e che l'RNA virale si replichi esclusivamente negli epatociti umani. L'HCV codifica una singola

poliproteina di 3011 amminoacidi costituita da proteine strutturali e non strutturali che vengono poi scisse le une dalle altre grazie ad una peptidasi dell'ospite (**Fig.1.1**).

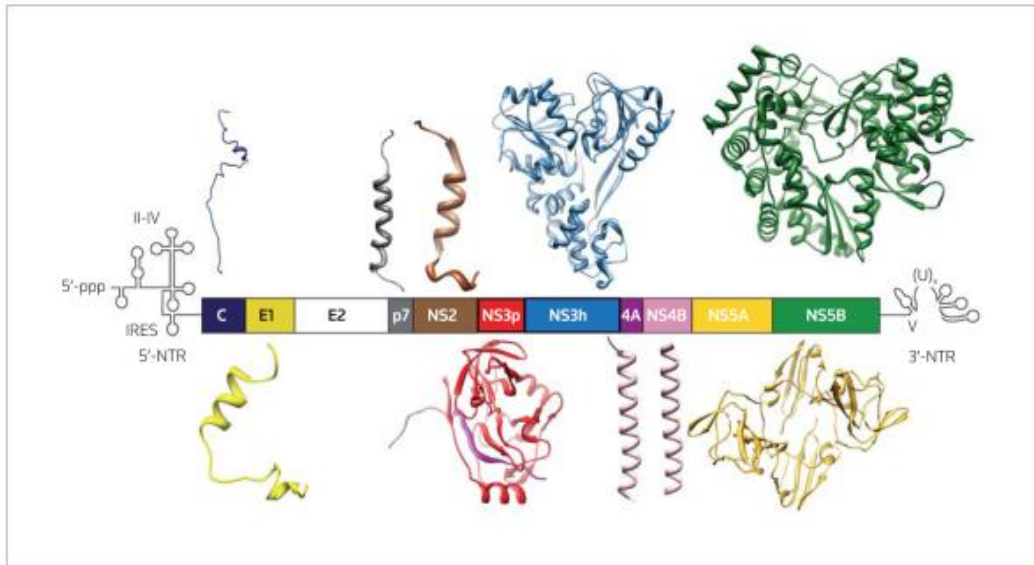


Fig. 1.1: Il genoma di HCV contiene proteine strutturali (C, E1, E2), proteine coinvolte nella morfogenesi del virione (P7, NS2) e proteine non strutturali responsabili della replicazione del genoma di HCV (NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). (43)

Vi sono sei genotipi di HCV (genotipi 1-6), molti sottotipi (a, b, c, ecc), e circa 100 ceppi diversi (1, 2, 3, e così via) in base all'eterogeneità di sequenza del genoma di HCV. I genotipi 1, 2 e 3 sono ampiamente distribuiti a livello globale, con i genotipi 1a e 1b responsabili del 60% delle infezioni in tutto il mondo. Il genotipo 1a si ritrova prevalentemente nell'Europa del nord e nel Nord America, mentre il genotipo 1b è frequente soprattutto nel sud e nell'est Europa e nel Giappone. Il genotipo 2 è meno comune rispetto al genotipo 1 e si trova più frequentemente in Europa che in Nord America. Il genotipo 3 è endemico nel Sud-Est asiatico, e il genotipo 4 è caratteristico del Medio Oriente, dell'Egitto e dell'Africa centrale. Il genotipo 5 lo si ritrova quasi esclusivamente in Sud Africa e il genotipo 6 è distribuito

principalmente in Asia. L'impatto del genotipo virale sulla patogenesi della malattia epatica rimane oggetto di controversia, ma l'influenza del genotipo sulla variabile risposta alla terapia è stato confermato: il genotipo 1 è generalmente associato ad una minor risposta alla terapia, mentre i genotipi 2 e 3 mostrano risposte più favorevoli; il genotipo 4 sembra avere un comportamento intermedio. (3)

1.5.2 Modalità di trasmissione:

L'HCV si trasmette generalmente per via parenterale; le vie di trasmissione più comuni e meglio conosciute sono le trasfusioni e/o il contatto parenterale con sangue infetto. Sono quindi fattori di rischio ben noti l'uso di droghe per via endovenosa, le trasfusioni di sangue, l'attività sessuale, l'emodialisi. La trasmissione del virus dell'epatite C è stato fortemente associato con l'assunzione di droga per via endovenosa e percutanea e, quindi, con l'utilizzo di aghi infetti. L'importanza del consumo di droga per via endovenosa non può essere sottovalutata. La prevalenza di HCV tra le persone che hanno acquisito l'HIV attraverso l'uso di droghe per via endovenosa raggiunge il 90% e la co-infezione dei due virus può rendere il trattamento più difficile. La maggior parte dei paesi in cui esiste una popolazione giovane di pazienti affetti da HCV deve fare i conti con l'uso di droghe per via endovenosa come causa principale per la diffusione del virus e molti di questi consumatori di droga per via endovenosa non sanno neanche di essere infetti. Screening per HCV e il trattamento di sostanze di abuso sono estremamente importanti in gruppi di pazienti come quello sopra citato. Le trasfusioni di sangue sono state una delle principali cause di trasmissione di HCV; tuttavia, grazie a una miglior selezione dei donatori, la trasmissione di HCV attraverso le trasfusioni è diminuita significativamente nei paesi più sviluppati. In Giappone, l'incidenza

post-trasfusionale di epatite non-A e non-B tra coloro che hanno subito meno di dieci trasfusioni è scesa dal 4,9% (1988-ottobre '89) al 1,9% (Nov'89-90), in seguito all'introduzione del test anti-HCV. Anche negli Stati Uniti, l'incidenza di epatite C post-trasfusionale è scesa dal 3,84% al 0,57% per paziente (0,03% per unità di sangue) in seguito all'introduzione nel 1990 del test per HCV. In Inghilterra, la frequenza di infezione da HCV in seguito a donazioni è scesa da 1 su 520.000 (1993-98) a 1 su 30 milioni (1999-2001), quando le donazioni sono state testate per l'RNA di HCV. Tuttavia, l'incidenza delle trasfusioni a cui viene correlata l'infezione da HCV è ancora elevata nelle altre aree del mondo. In uno studio su 147 pazienti cileni con epatite C cronica, il fattore di rischio più comune era la trasfusione di sangue (54% dei casi contro solo un 5% dovuto all'uso di droghe per via endovenosa). Un altro importante studio è stato fatto nella più grande banca del sangue di Santa Catarina (Brasile) tra il 1991 e il 2001 e questo mostra un significativo calo del rischio di contrarre HCV, anche se il rischio più basso che è stato riscontrato (pari a 1:13721) era ancora almeno 10 volte più alto rispetto a quello dei paesi sviluppati. Il ruolo dell'attività sessuale nella trasmissione di HCV non è chiaro ; da vari studi sembra che la trasmissione sessuale di HCV sia ancora rara anche se rimane a valori più alti tra coloro con comportamenti sessuali a rischio. È stato ben documentato che i pazienti dializzati hanno un più alto tasso di infezione da HCV. Negli anni '90 gran parte del mondo ha riferito tassi di prevalenza dal 10 al 50% tra i pazienti in emodialisi con tassi più bassi in luoghi come l'Irlanda (1,7%). Uno studio svolto in Arabia Saudita ha mostrato che il tasso di prevalenza di HCV nei pazienti in emodialisi era pari a 9,24% rispetto a un valore di 0,30% tra i donatori di sangue. In un altro studio svolto a Città del Messico (Messico), la prevalenza di HCV era del 6,7% nei pazienti in emodialisi rispetto alla prevalenza dell' 1,2% circa nella popolazione del Messico. Il tasso di

sieroconversione tra i pazienti in emodialisi, senza altri fattori di rischio, è stata stimata a 1,38-1,9% / anno. Questi studi portano alla conclusione che la trasmissione del virus ai pazienti in emodialisi è una trasmissione generalmente nosocomiale in cui i possibili fattori di rischio potrebbero essere la mancata efficiente disinfezione dei dispositivi tra un paziente e l'altro, la condivisione di flaconi monouso per l'infusione, la scarsa pulizia delle macchine per la dialisi ecc. . (4)

1.5.3 Caratteristiche cliniche:

Il virus dell'epatite C è un'importante causa sia di epatite acuta che cronica. Anche per l'epatite C, come per tutte le malattie, il decorso clinico è variabile ; non esiste un decorso clinico "tipico" o una storia naturale della malattia, ma piuttosto un ampio spettro di presentazioni cliniche della malattia. Negli Stati Uniti, l'epatite C rappresenta circa il 20% dei casi di epatite acuta. Clinicamente l'epatite C acuta è simile ad altre forme di epatite virale acuta con insorgenza di sintomi quali malessere, nausea e dolore al quadrante superiore destro seguiti da urine scure e ittero. Il periodo di incubazione medio per la comparsa dei sintomi è di 7 settimane. Tuttavia, molto prima della comparsa dei sintomi, appaiono i marcatori virali di infezione: l'RNA di HCV diventa rilevabile nel siero dopo 1 o 2 settimane dall' esposizione. Dopo diverse settimane, i livelli sierici di alanina aminotransferasi (ALT) cominciano ad aumentare e, poco dopo, compaiono anche i sintomi clinici. La gravità della malattia acuta è variabile; virtualmente tutti i pazienti infetti hanno un innalzamento transitorio di ALT; tuttavia, solo un terzo dei pazienti sviluppa ittero o sintomi; nei restanti casi, la malattia è priva di ittero e rimane subclinica. Se clinicamente apparente, la malattia dura in genere da 2 a 12 settimane. L'epatite C acuta può sfociare in epatite fulminante,

anche se questo è piuttosto raro. Nel caso in cui la malattia sia autolimitante l'RNA virale non è più rilevabile nel giro di poche settimane dalla comparsa dei sintomi e i livelli di aminotransferasi ritornano alla normalità. Purtroppo, l'epatite autolimitante non è il decorso più comune dell'infezione da HCV; nella maggior parte dei pazienti i sintomi dell'epatite acuta si risolvono ma i livelli di ALT rimangono elevati e l'RNA di HCV persiste. In effetti, la propensione alla cronicità è la caratteristica più distintiva dell'epatite C e questo si verifica in almeno l'85% dei pazienti con infezione acuta da HCV. I fattori che portano alla cronicità non sono ben definiti ma un fattore chiave potrebbe essere la tendenza del genoma virale a mutare rapidamente in modo da schivare costantemente il riconoscimento da parte del sistema immunitario attraverso mutazioni negli epitopi antigenici verso cui nessun anticorpo neutralizzante è stato ancora creato. Tipicamente, i pazienti con epatite C cronica hanno pochi o nessun sintomo e, se presenti, questi sono di solito aspecifici, intermittenti, e lievi. Il sintomo più comune è la stanchezza, ma anoressia, nausea, dolore al quadrante superiore destro, urine scure e prurito possono verificarsi, soprattutto se la malattia è grave o piuttosto avanzata. La maggior parte dei pazienti continua ad avere aumentati livelli sierici di transaminasi ma non tutti i pazienti che continuano ad essere viremici mantengono livelli elevati di ALT. Nella maggior parte delle indagini, circa un terzo dei pazienti con infezione cronica da HCV ha persistentemente livelli sierici di ALT normali, e in altri i livelli di ALT sono solo fuori norma in maniera intermittente. Questi pazienti sono stati indicati come portatori sani di HCV, ma questo termine è ingannevole e deve essere evitato. Biopsie del fegato in pazienti con infezione cronica da HCV con livelli di ALT normali mostrano evidenza istologica di epatite cronica in quasi tutti i pazienti, anche se il grado di danno epatico è generalmente mite. Fibrosi grave e cirrosi sono invece molto rare in pazienti con infezione cronica da HCV e

normali valori di aminotransferasi sierica. La maggior parte dei pazienti ha una lieve epatite cronica (epatite cronica persistente: 41%) o cambiamenti minimi e non specifici (25%). In una piccola percentuale (13%), l'istologia viene interpretata come normale. Anche nei pazienti con risultati più attivi (epatite cronica attiva: 22%), non è chiaro se la malattia sia progressiva, nel senso che l'istologia epatica può riflettere danni precedenti piuttosto che danni in corso. Tuttavia, è più opportuno dire che questi pazienti hanno una lieve o subclinica epatite cronica C che riferirsi a loro come portatori sani di HCV. La prognosi in questi pazienti non è stata ben definita, ma può essere piuttosto eccellente. (5)

1.6 I portatori cronici di HBV

Dopo un'infezione iniziale da HBV, una parte dei pazienti non riesce ad eliminare il virus dal sangue e diventa portatore cronico per molti anni o per tutta la vita. I portatori cronici di HBV, oltre alle particelle virali infettive, producono grandi quantità di proteine dell'involucro, non infettive, che sono rilevate negli esami per gli antigeni di superficie dell'epatite B (HBsAg). Il rischio di diventare un portatore di HBsAg è fortemente dipendente dall'età: $\leq 5\%$ dei soggetti infettati con l'HBV da adulti diventano portatori cronici di HBsAg, mentre $\geq 95\%$ guariscono completamente e sviluppano un anticorpo protettivo contro l'HBsAg (anti-HBs). Al contrario, prima che fosse introdotta di routine la somministrazione profilattica delle immunoglobuline e l'immunizzazione, il 90% ed oltre dei neonati infettati nel periodo perinatale diventavano portatori cronici ed erano esposti al rischio di progressione verso la cirrosi ed il carcinoma epatocellulare. Secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, il numero dei portatori di HBsAg è approssimativamente di 400 milioni in tutto il mondo, con una prevalenza fino al 10% in alcune nazioni asiatiche, da 0,1 a 0,5% nella

popolazione generale degli Stati Uniti e da 0,02 a 0,04% tra i donatori di sangue statunitensi. Una piccola percentuale (<10%) dei portatori di HBsAg sviluppa dei sintomi clinici come l'insufficienza epatica, la cirrosi o il carcinoma epatocellulare. (1)

1.7 I portatori cronici di HCV

I soggetti che si sono inizialmente infettati con l'HCV diventano, per la maggior parte, portatori cronici e il 75-85% di essi mantiene l'HCV RNA nel siero e nel fegato per anni o decenni. Almeno il 50% di questi portatori di HCV presentano l'evidenza biochimica ed istologica di un'inflammatione epatica cronica. Nonostante questo processo infiammatorio cronico, la maggior parte degli individui infetti resta asintomatica. Durante i primi 20 anni dopo l'infezione, l'HCV è di solito indolente ed è associato con una bassa mortalità e morbilità. Uno studio ha documentato che le persone con una malattia epatica a livello clinico rappresentano circa il 10% del totale dei soggetti infettati. Il rischio relativo alla frequenza con cui l'epatite cronica possa, di per sé, evolvere in cirrosi epatica è sconosciuto, ma si ritiene che l'alcool possa giocare un ruolo sinergico nell'esacerbare l'epatite cronica di tipo C. L'HCV post-trasfusionale nei bambini che si sono infettati dopo interventi di chirurgia cardiaca sembra risolversi con una frequenza maggiore rispetto a quanto rilevato per gli adulti, presentando una infezione moderata dopo almeno 20 anni di controlli periodici. Le raccomandazioni per la gestione clinica delle persone con l'infezione cronica da HCV sono state sviluppate da una consensus conference del National Institutes of Health e sono state arricchite ed ampliate successivamente da altri autori. (1)

1.8 I marcatori di infezione virale

Gli esami di laboratorio possono identificare i marcatori di un'infezione pregressa o in atto per l'HBV e l'HCV che risultano utili ai fini dello screening e della diagnosi. La **Tabella 1.1** elenca i marcatori molecolari e sierologici comunemente utilizzati per la diagnosi di epatite. Il periodo intercorrente tra l'esposizione all'HBV e l'insorgenza dei marcatori dell'infezione nel sangue (HBV DNA o HBsAg) di solito è di circa 6 settimane. Il DNA dell'HBV rilevabile con la tecnica dell'amplificazione di acidi nucleici (NAT) è il primo marcatore che si evidenzia, seguito dall'HBsAg. L'anticorpo specifico per la proteina del core dell'HBV (anti-HBc) di solito compare diverse settimane dopo, prima come IgM e poi come IgG. La scomparsa dell'HBsAg e la comparsa dell'anti-HBs indicano la risoluzione dell'infezione. Due ulteriori marcatori dell'HBV, l'HBeAg oppure il suo anticorpo (anti-HBe), sono utili per la diagnosi e la prognosi, ma non vengono utilizzati per lo screening dei donatori. Un individuo HBsAg-positivo asintomatico può trovarsi o nella fase precoce di un'infezione acuta da HBV (senza anti-HBc o con le IgM anti-HBc), oppure essere un portatore cronico di HBV (con le IgG anti-HBc). Le particelle di HBsAg vengono prodotte in eccesso durante l'infezione acuta o cronica; il sangue di un individuo con in circolo l'HBsAg può infettare altri individui. È stata descritta la trasmissione dell'HBV da parte di donatori risultati HBsAg sieronegativi. Gli esami NAT permettono di rilevare fino a meno di 10 copie genomiche di DNA dell'HBV. La validità del NAT per indagare i donatori sieronegativi che sono infettati con l'HBV è in corso di valutazione ma può essere di impiego limitato per l'elevata sensibilità degli esami che vengono attualmente utilizzati per l'HBsAg e per la lenta crescita dei livelli di DNA HBV, diversamente dall'HIV e dall'HCV. È possibile che l'effettivo riscontro dei donatori risultati

sieronegativi, ma in realtà infetti per l'HBV, richiederà l'esame NAT a livello di singola donazione. (1)

Tabella 1.1: Esami molecolari e sierologici nella diagnosi dell'epatite virale di tipo B

Virus	Reattività ai test							Interpretazione
	DNA	HBsAg	Anti-HBc Tot	IgM	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe	
HBV	+	-	-	-	-	-	-	Periodo finestra
	+	+	+/-	+/-	-	+/-	-	Infezione acuta iniziale HBV/Portatore cronico
	+	+	+	+	-	+	-	Infezione acuta
	+/-	-	+	+	-	+/-	+/-	Convalescenza iniziale dell'infezione/Possibile portatore cronico iniziale
	+/-	+	+	-	-	+/-	+/-	Portatore cronico
	-	-	+	-	+	-	+/-	Infezione risolta
	-	-	-	-	+	-	-	Vaccinato o infezione risolta
	-	-	+	-	-	-	-	Infezione Risolta? Falso positivo?

I vaccini per l'HBV contengono le proteine HBsAg non infettanti che possono determinare dei falsi positivi nei risultati dei test di screening per l'HBsAg per pochi giorni dopo l'inoculazione. Gli anticorpi protettivi risultanti dalla vaccinazione sono specifici solo per l'HBsAg e la vaccinazione non determina la produzione di anticorpi anti-HBc.

Gli esami per l'HCV sono test immunoenzimatici (EIA) che utilizzano antigeni ricombinanti dell'HCV fissati in fase solida. L'anti-HCV è rilevabile con il test EIA di terza generazione circa 10 settimane dopo l'infezione. L'HCV RNA è presente in concentrazione elevata nel plasma durante la maggior parte del periodo intercorrente tra l'esposizione e la sierconversione anticorpale. L'anti-HCV viene rilevato nel 40-50% dei pazienti che sono nella fase iniziale della diagnosi di epatite acuta, sia nei casi trasmessi con la trasfusione che in quelli acquisiti in comunità. Il significato clinico di un test di screening risultato positivo per l'anti-HCV in un donatore di sangue in buona salute non è definitivo senza ulteriori indagini. Circa lo 0,21% dei donatori statunitensi presentano risultati ripetutamente reattivi nel test EIA. Diverse generazioni di test ricombinanti in immunoblot (RIBA e/o INNO-LIA) sono state approvati dalla Food and Drug Administration(FDA) per ulteriori accertamenti su risultati ripetutamente reattivi in EIA. Un soggetto che risulta positivo con il RIBA viene considerato vero positivo per anti-HCV; nel 70-90% di questi casi, l'acido nucleico dell'HCV risulta rilevabile con i metodi NAT. L'infettività delle unità positive per l'HCV RNA si avvicina al 100%. Al contrario, i donatori ripetutamente reattivi in EIA con risultati negativi o indeterminati con il RIBA, che rappresentano il 37% dei donatori risultati ripetutamente

reattivi in EIA, sono solo raramente infetti o infettanti. Indipendentemente dai risultati del RIBA, una donazione con un ripetuto risultato reattivo in EIA non può essere utilizzata per la trasfusione. Nel 1999, il NAT per HCV RNA venne introdotto come esame di screening per il donatore sotto il controllo della FDA. Il periodo finestra per il rilievo dell'HCV con il NAT in pool viene ridotto di 10-30 giorni. Dopo aver testato più di 39 milioni di donatori, circa 1:270.000 soggetti è risultato positivo al test NAT e ancora nel periodo finestra sieronegativo. I risultati NAT possono essere utilizzati in circostanze specifiche al posto degli esami supplementari. È necessaria una modifica di procedura da parte della FDA. È stato anticipato che gli esami NAT HCV possano essere utilizzati in futuro per la riammissione. (1)

Tabella 1.2: Esami molecolari e sierologici nella diagnosi dell'epatite virale di tipo C.

Virus	Reattività ai test						Interpretazione		
	RNA	Anti-HCV (screening EIA)	Antigeni (INNO-LIA HCV Score)						
			C1	C2	E2	NS3	NS4	NS5	
HCV	+/-	+	Non disponibile						Probabile infezione HCV acuta o cronica (se l'RNA è positivo)
	-	+	-	-	-	-	-	-	Falso Positivo
	+/-	+	±	-	-	-	-	-	Falso positivo (se l'RNA è negativo); possibile infezione acuta (se l'RNA è positivo)
			-	±	-	-	-	-	
			-	-	-	-	±	-	
	+/-	+	Almeno due antigeni con reattività maggiore o uguale a ±						Infezione acuta o cronica iniziale (se l'RNA è positivo); falso positivo o risoluzione ritardata (se l'RNA è negativo)

Il virus HBV proveniente da un trapianto di fegato di un donatore risultato positivo nel test per anti-HBc, ma negativo per l'HBsAg, venne trasmesso al ricevente del trapianto e svariate pubblicazioni della letteratura scientifica dimostrano che trasfusioni di sangue reattivo per l'anti-HBc, ma negativo per l'HBsAg, sono state associate in alcuni riceventi con lo sviluppo di un'epatite B. Vi può essere un piccolo numero di donatori potenzialmente infetti con HBsAg mutanti del virus B che possono non essere rilevati in modo ottimale con i test per HBsAg attualmente autorizzati. I donatori risultati ripetutamente reattivi per l'anti-HBc in due

diverse occasioni, o risultati ripetutamente reattivi con due tipologie di reagenti diversi, devono essere sospesi.

Il rischio di un'infezione post-trasfusionale da HBV o HBC si è ridotto in modo drammatico fino ad un rischio stimato fra 1 su 60.000 e 1 su 100.000 prima dell'applicazione della metodologia NAT HCV. Dal 1994 non è stato rilevato dai CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, Centri per la prevenzione ed il controllo delle malattie) "*Sentinel Countries Viral Hepatitis Surveillance System*" nessun nuovo caso di trasmissione di HCV tramite trasfusione. Lo sviluppo di test per HCV sempre migliori e le misure restrittive di selezione dei donatori hanno contribuito a questa notevole diminuzione ed attualmente la trasfusione non viene più considerata come il fattore di maggior rischio per la trasmissione dell'HCV. Lo screening per l'acido nucleico dell'HCV è stato applicato dai Centri Trasfusionali nel 1999. In tre anni di esami NAT, sono state identificate negli Stati Uniti 170 donazioni sieronegative NAT positive nello screening di 39,7 milioni di donazioni. La NAT ha probabilmente ridotto il rischio residuo per la trasmissione dell'HCV a ≤ 1 su 2.000.000 di emocomponenti trasfusi.

Le donazioni con risultati ripetutamente reattivi dei test di screening (HBsAg, anti-HBc e/o anti-HCV) non possono essere utilizzate per la trasfusione. Inoltre può essere necessario porre in quarantena gli emocomponenti non scaduti raccolti nei periodi precedenti all'attuale donazione e può essere richiesto l'invio di una notifica per la rintracciabilità del ricevente (*look back*). Sulla base dei risultati ottenuti con test supplementari certificati, e test di screening precedenti, le unità in quarantena possono essere rese idonee per trasfusione o ulteriori lavorazioni, oppure possono essere distrutte. (1)

Ricapitolando i test effettuati sulle donazioni di sangue sono:

Epatite B:

- Saggio per l' HBsAg
- HBV NAT

Se il test per l'HBs Ag risulta reattivo, si procede ad eseguire tutto il pannello dei vari antigeni/anticorpi HBV (HBcAb Tot, HBcAb IgM, HBeAg, HBeAb, HBsAb quantitativo)

Epatite C:

- Anti-HCV
- HCV NAT

Se il test anti-HCV risulta reattivo, si procede ed effettuare il test di conferma per HCV

1.9 Obblighi di legge sulle donazioni

Il Decreto 3 Marzo 2005 emanato dal Ministero della salute "Protocolli per l'accertamento della idoneità del donatore di sangue e di emocomponenti" e le successive modifiche ad esso apportate regolamentano specificatamente quali sono gli esami obbligatori da effettuare ad ogni donazione :

Titolo III: Esami obbligatori ad ogni donazione e controlli periodici

Art. 10: Validazione biologica delle unità di sangue e /o di emocomponenti

1. Ad ogni donazione il donatore viene obbligatoriamente sottoposto agli esami di laboratorio di cui all'allegato n. 7, parte A e B, volti ad escluderne la positività degli indicatori delle malattie trasmissibili e ad individuarne le principali caratteristiche immunoematologiche.
2. L'eventuale positività di campioni di sangue alla prova di verifica iniziale, relativa alle indagini per le malattie trasmissibili, rende obbligatoria la ripetizione delle analisi tenendo conto dell'algoritmo di cui all'allegato n. 8.

Allegato 7:

A) Ad ogni donazione il donatore è sottoposto ad esame emocromocitometrico completa.

B) Validazione biologica: su ogni donazione, l'esito della determinazione del test ALT non deve essere superiore a due volte il limite normale. Ogni donazione deve risultare negativa ai seguenti esami:

-Sierodiagnosi per la Lue;

-HIV Ab;

-HBs Ag;

-HCV Ab;

-HCV NAT

- HBV NAT

- HIV NAT

Nel caso in cui i campioni di sangue risultino positivi alle indagini virologiche iniziali, si procede alla ripetizione dell'esame tenendo conto dell'algoritmo di cui all'allegato n. 8.

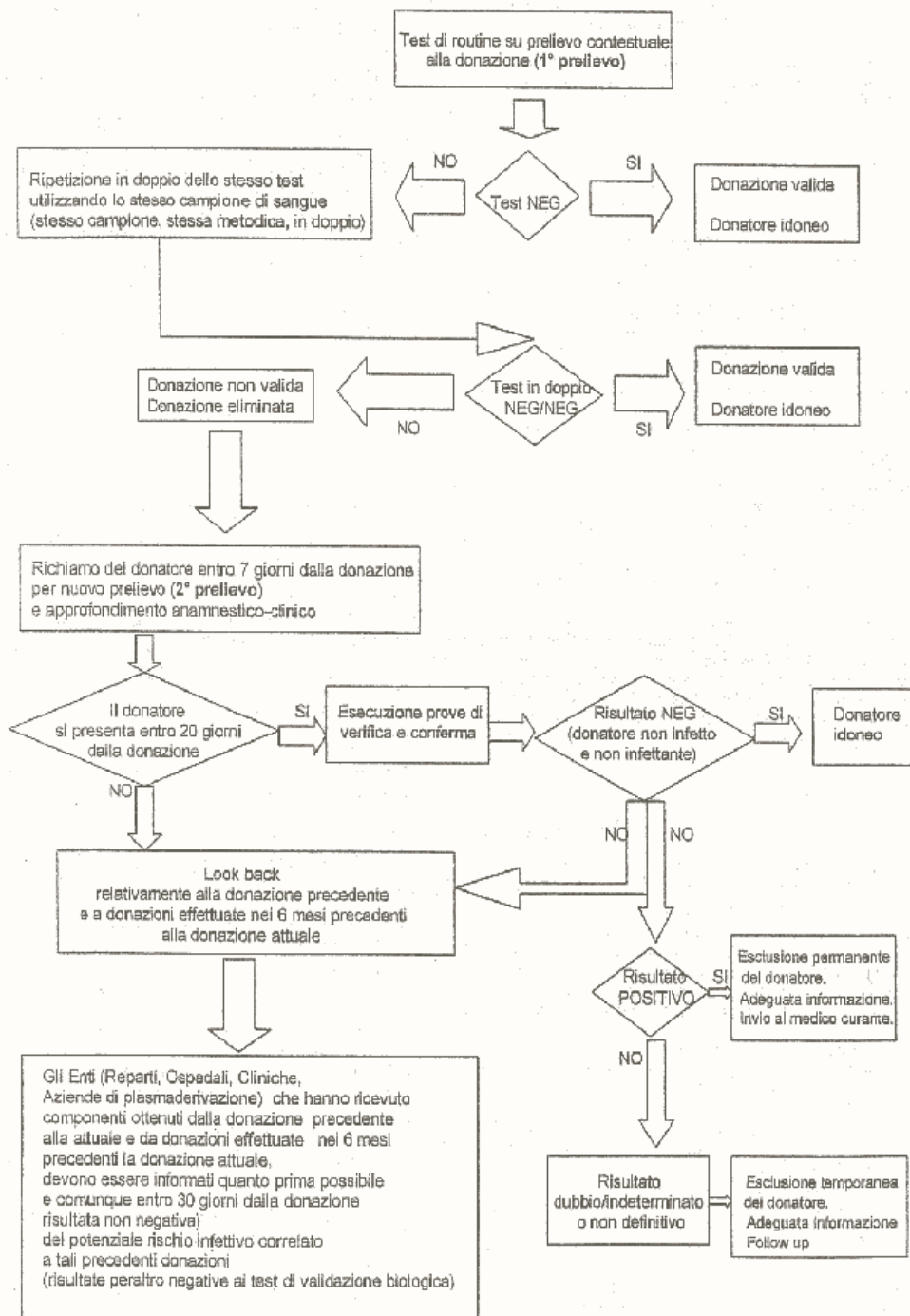
C) Esami per il donatore periodico: Il donatore, oltre agli esami indicati ai precedenti punti A e B, ogni anno è sottoposto ai seguenti esami:

- Creatininemia
- Glicemia
- Proteinemia ed elettroforesi sieroproteica
- Colesterolemia
- Trigliceridemia
- Ferritinemia

Allegato n. 8: Algoritmo da applicare nei casi di riscontro di sieropositività alle indagini virologiche iniziali. (6)

(vedere pagina seguente)

Algoritmo da applicare nei casi di riscontro di sieropositività alle indagini virologiche iniziali



1.10 I campioni negativi, positivi e reattivi

Un campione viene identificato come Negativo quando presenta valori dei test di screening inferiori al valore di *cutoff*.

Un campione viene identificato come Reattivo quando presenta valori dei test di screening superiori al valore di *cutoff* anche se, tali valori, non sono confermati dagli appropriati e successivi test di conferma.

Un campione viene identificato come Positivo quando presenta valori dei test di screening superiori al valore di *cutoff* e, tali valori, sono confermati dai successivi test di conferma.

1.11 La gamma-glutamyltransferasi (GGT)

La GGT è un enzima largamente diffuso e conservato nel mondo vivente: nei batteri, nelle piante e in tutto il Regno Animale. In particolare, nei mammiferi la GGT è una glicoproteina dimerica di membrana di tipo II con legami intramolecolari di tipo elettrostatico (7); deriva da un unico pro-peptide (8) scisso nelle sue due subunità, una pesante (380 amminoacidi, 55-62 KDa) ed una leggera (189 amminoacidi, 20-30 KDa) unite da legami non covalenti, prima di raggiungere la superficie plasmatica. Mediante il dominio idrofobico transmembrana, in posizione N-terminale della catena pesante, si ha l'inserzione dell'enzima nella membrana cellulare. Il dominio intracellulare è costituito da quattro amminoacidi, mentre, la restante porzione della proteina si trova nell'ambiente extracellulare (9; 10) e corrisponde alla catena leggera nella quale è localizzato anche il sito catalitico, per cui questo si trova ad interagire solo con i substrati presenti all'esterno della cellula (7; 11). Sebbene sia stato dimostrato che la catena leggera possa avere anche attività proteasica e capacità di digerire la catena pesante (12), tale attività in vivo sembra essere mascherata

dalla catena pesante stessa. La sua funzione principale è quella di catalizzare il primo passaggio del processo di degradazione del glutatione (GSH) extracellulare attraverso la scissione del legame γ -glutamminico.

Nei mammiferi, è stato dimostrato che la GGT si trova sulla membrana di tutte le cellule, preferenzialmente espressa da tessuti epiteliali implicati in attività secretorie e di assorbimento. Nel rene, in particolar modo sulla superficie luminale delle cellule del tubulo contorto prossimale, è stata riscontrata la più alta attività di GGT mentre l'epitelio cubico del tubulo distale e la rete mirabilis arteriosa glomerulare ne sono praticamente privi. Nel fegato l'attività è presente sui biliociti dei colangioli porto biliari e dei dotti biliari intra- ed extra-epatici, mentre nel pancreas è presente nelle cellule acinose del lobulo. Forte immunoreattività è stata inoltre osservata sulla superficie di cellule a funzione biologica diversa, quali l'endotelio del corpo ciliare, quello del midollo spinale, quello dei plessi corioidei e del microcircolo della barriera ematoencefalica, la cui presenza risulta essere importante nei processi di detossificazione di xenobiotici e nel metabolismo dei leucotrieni vasoattivi (13). Altre sedi dove è possibile rilevare la GGT sono gli epitelii di ghiandole esocrine come le sudoripare e le sottomandibolari, ma anche i dotti escretori galattofori, l'epitelio ciliato bronchiale, le vescicole seminali e la ghiandola tubulo acinosa prostatica (14). Attività di GGT può essere individuata anche sulla membrana e nei granuli intracitoplasmatici di piastrine e leucociti ed in particolare di granulociti polimorfonucleati e di linfociti, il cui eventuale aumento citoplasmatico di attività è considerato un marcatore di differenziazione e trasformazione neoplastica (15; 16; 17). Attività di GGT è inoltre presente nel siero, dove la GGT viene probabilmente rilasciata dalle membrane cellulari dei

parenchimi dei vari organi, e le cui variazioni rispecchiano le modificazioni quantitative della produzione, del rilascio e della rimozione dell'enzima circolante (18).

La GGT è una glicoproteina altamente glicosilata e, sulla base della sequenza primaria, sono state scoperte sei plausibili sequenze consenso di N-glicosilazione. La N-glicosilazione costituisce il 25-30% della massa totale della GGT ed è tessuto specifica; infatti, la GGT purificata da organi diversi presenta un diverso peso molecolare e, quindi, una differente mobilità elettroforetica. Le GGT purificate da diversi organi hanno inoltre punti isoelettrici diversi sulla base del contenuto di acido sialico. Proprio sulla base di questa eterogeneità di glicosilazione si può pensare ad isoforme enzimatiche per la GGT, mentre ad oggi non sono stati individuati isoenzimi per la sequenza amminoacidica.

1.11.1 Meccanismo d'azione della GGT e misura della sua attività

La GGT catalizza l'idrolisi del legame γ -glutamilico tra il gruppo carbossile in posizione γ dell'acido glutammico e un'ammina e il conseguente trasferimento dell'acido glutammico su un accettore (**Figura 1.2**). La reazione catalizzata dalla GGT presenta la seguente formula:

Gamma-glutammiil-X + accettore \rightarrow Gamma-glutammiil-accettore + X

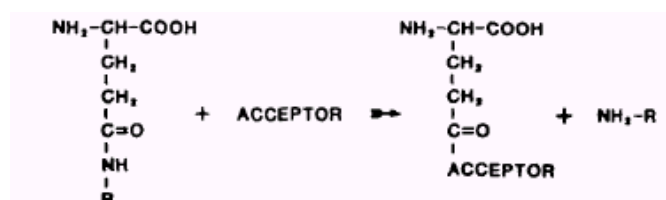


Figura 1.2: Reazione catalizzata dalla GGT (Hanigan,1998)

e un'ampia varietà di composti può partecipare come γ -glutammina donatore o accettore. La reazione catalizzata dalla GGT segue un meccanismo definito a ping-pong: nello stadio di acilazione il gruppo γ -glutamminico della molecola substrato è trasferito sul gruppo OH della Thr N-terminale della catena leggera ed è liberata l'ammina. L'intermedio acil-enzima lega una molecola accettore e, nel successivo stadio di deacilazione, l'acido glutammico è trasferito sul gruppo amminico dell'accettore con la formazione di un nuovo legame γ -glutamminico (reazione di transpeptidazione). In mancanza di un accettore l'acil-enzima può reagire anche con una molecola di acqua con la liberazione di acido glutammico mediante una reazione di idrolisi. In questo tipo di reazione la GGT è aspecifica per il substrato, ma è molto specifica per il tipo di legame e questo perché solo la posizione γ -glutamminica è critica per il legame con l'enzima GGT; tutti i γ -glutamminocomposti sono possibili substrati per la GGT.

Tra i gamma-glutamminici donatori, il principale substrato fisiologico dell'enzima, è il glutatione (gamma-glutamminicisteinilglicina). Gli accettori sono amminoacidi o peptidi: cistina, L-cisteina, L-glutammina, L-alanilglicina, L-serilglicina e glicilglicina. La GlyGly è l'accettore migliore: in vivo però il più indicato è la Cisteina, mentre in laboratorio si usa la GlyGly perché più stabile come reagente e inerte rispetto ai comuni modelli cellulari ed enzimatici usati.

I substrati artificiali più usati per la determinazione dell'attività di GGT sono: gamma-glutamminil- β -naftilamide, gamma-glutamminil-p-nitroanilide e gamma-glutamminil-3-carbossi-4-nitroanilide. Le nitroanilidi hanno il vantaggio di essere substrati cromogeni e ciò permette di monitorare continuamente il progredire della reazione con l'ausilio di uno spettrofotometro. Nell'ambito dei laboratori di analisi chimico-cliniche è preferito il substrato gamma-glutamminil-

3-carbossi-4-nitroanilide perché più solubile del corrispondente non carbossilato. L'attività di GGT è abitualmente misurata valutando la cinetica d'azione mediante l'uso di metodi spettrofotometrici, precisi nell'analisi e poco costosi. Ne è un esempio il metodo IFCC, raccomandato per l'analisi dell'attività sierica dell'enzima.

1.11.2 Funzioni fisiologiche

Come precedentemente menzionato, il glutatione è il più abbondante substrato fisiologico della GGT. Il glutatione è composto da acido glutammico, cisteina e glicina (γ -glutamylcysteinylglycine) e presenta la particolare caratteristica di avere i residui di acido glutammico e di cisteina uniti non da un normale legame peptidico, ma da un legame γ -glutamminico: è infatti il gruppo carbossilico (-COOH) sul carbonio γ dell'acido glutammico ad essere legato al gruppo amminico (-NH₂) sul carbonio α della cisteina (**Fig.1.3**).

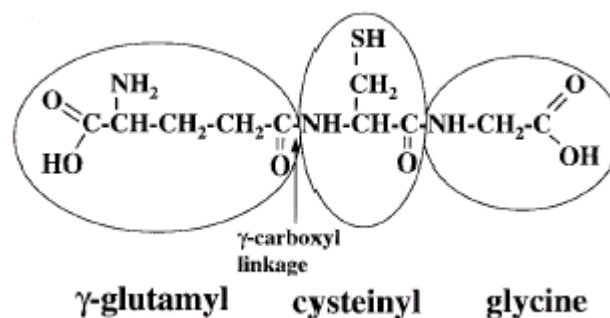


Figura 1.3: Rappresentazione della struttura del glutatione (γ -glutamylcysteinylglycine). La freccia indica il legame γ -glutamminico .

Il GSH ha molte funzioni biologiche importanti, tra cui la coniugazione di composti elettrofili, il mantenimento del normale stato redox dell'ambiente intracellulare tramite reazioni di interscambio tiolico e azione "scavenger" dei radicali liberi; inoltre è cofattore di enzimi con

funzione anti-ossidante (GSH-perossidasi, deidroascorbato reductasi GSH-dipendente). Il mantenimento della concentrazione intracellulare del GSH è quindi di fondamentale importanza per la sopravvivenza delle cellule. La concentrazione intracellulare di GSH dipende dall'equilibrio che si instaura tra il suo consumo e la sua sintesi, quest'ultima regolata dall'apporto di aminoacidi costituenti. La GGT è l'unico enzima che può dare inizio alla degradazione del GSH extracellulare rendendo possibile la successiva captazione degli aminoacidi che lo compongono da parte della cellula (ciclo del γ - glutammile). La GGT trasferisce il gruppo glutammilico del GSH su accettori aminoacidici o dipeptidici; i γ - glutammil-amminoacidi e i γ -glutammil-dipeptidi sono quindi trasportati all'interno della cellula dove diventano substrato dell'enzima γ -glutammil-ciclotransferasi che li scinde nei corrispondenti aminoacidi e 5-oxoprolina, la quale può essere convertita a glutammato e usata per la sintesi del GSH intracellulare. Dalla reazione catalizzata dalla GGT è liberato anche il dipeptide cisteinilglicina (CysGly). Le dipeptidasi di membrana idrolizzano la CysGly a cisteina (Cys) e glicina (Gly) che, trasportate all'interno delle cellule, possono essere utilizzate per la sintesi di GSH. La GGT è considerata un enzima ancillare dei sistemi antiossidanti basati sul GSH: da questo punto di vista l'enzima avrebbe un ruolo protettivo contro il danno ossidativo intracellulare. Il ciclo del γ -glutammile può essere interpretato anche come un continuo riciclo del GSH attraverso la membrana plasmatica; infatti nelle cellule di mammifero è stato documentato un efflusso continuo di GSH, secondo gradiente di concentrazione, millimolare all'interno della cellula e micromolare all'esterno. Un'altra importante funzione del GSH è quella di trasportatore della Cys, altrimenti estremamente instabile nell'ambiente extracellulare in quanto si auto- ossida a cistina (Cis), promuovendo la generazione di specie reattive dell'ossigeno. La GGT promuove il recupero di Cys

degradando il GSH a CysGly; inoltre la Cys è l'accettore più efficiente della reazione di transpeptidazione, perciò anche il tripeptide γ -GluCys contribuisce al recupero di Cys. La Cys è un substrato limitante per la sintesi del GSH, ma anche per la sintesi proteica in generale, in quanto è un amminoacido essenziale. L'importanza della GGT per il recupero della Cys extracellulare è stata dimostrata in studi con topi "knock-out" per l'espressione di GGT. Gli animali omozigoti presentano glutationuria, ridotta concentrazione di GSH cellulare e di Cys plasmatica, ritardi nella crescita, infertilità, cataratta, maggiore tasso di mutazioni geniche. Tutti questi aspetti fenotipici possono essere normalizzati tramite la somministrazione di N-acetilcisteina come fonte di Cys. Nella funzione di recupero degli amminoacidi costituenti il GSH o di utilizzo di questo come fonte di Cys, la GGT deve agire in concerto con altri enzimi di membrana capaci di idrolizzare il legame peptidico della CysGly. Le dipeptidasi più probabilmente coinvolte sono l'amminopetidasi-N (ApN, CD13) e la "membrane-bound dipeptidase" (MBD). L'enzima ApN è specifica per la forma ridotta di CysGly (K_m 2,5 mM), che è invece un inibitore della MBD, per la quale è un ottimo substrato la forma ossidata cistinil-bis-glicina (K_m 0,6 mM). A causa dell'alta reattività del tiolo della CysGly è probabile che questa si ossidi velocemente nell'ambiente extracellulare; per questo la MBD potrebbe svolgere un ruolo prominente nel metabolismo del GSH. La coespressione tissutale della MBD e della GGT è stata studiata ad oggi solo nel topo: alti livelli di attività di entrambi gli enzimi sono stati riscontrati nell'epitelio del tubulo renale e dell'intestino tenue, mentre in altri tessuti (polmone, vescicole seminali, fegato fetale) l'espressione è discordante. Nel rene e nell'intestino è possibile che la GGT e la MBD siano coinvolte entrambe nel metabolismo del GSH extracellulare, mentre in altri tessuti potrebbero partecipare indipendentemente ad altri processi metabolici. (30)

1.11.3 Significato diagnostico della GGT totale sierica

L'enzima GGT può essere determinato sia nel siero che nel plasma in modo indifferente, (usando come anticoagulanti eparina, o meglio ancora litio eparina; è sconsigliato invece l'uso di EDTA o citrato), ma il campione che viene più comunemente usato per fare le rilevazioni è il siero. Nel sangue l'enzima è poco stabile e si riscontrano abbassamenti di concentrazione rilevanti nell'arco della giornata, mentre nel plasma e nel siero l'enzima è stabile per anni a temperature molto basse (-20 °C) e per circa una settimana a 4-8 °C oppure a 20-25 °C. In clinica, dal 1961 la determinazione dell'attività enzimatica della GGT nel siero viene utilizzata come marcatore diagnostico di funzionalità epatica (19), attraverso un esame di routine che viene eseguito in laboratorio mediante il saggio con il substrato γ -glutamyl-p-nitroanilide, dal momento che un innalzamento dei suoi valori sono stati osservati in seguito a colestasi, a steatosi, anche indotte dall'abuso di alcol o da farmaci. L'elevazione di GGT sierica può essere riscontrata in pazienti con epatopatia cronica conseguente all'infezione da HCV nei quali rappresenta un indice prognostico sfavorevole di risposta al trattamento con interferone (20; 21), ma anche in epatocarcinoma. Studi epidemiologici condotti sulla GGT nell'ultimo decennio hanno messo in luce come non vi è solo una connessione con le malattie epatiche, ma la GGT rappresenta un fattore indipendente di rischio di mortalità, per l'incidenza di infarto del miocardio e morte cardiaca, ictus cerebrale, sindrome metabolica, diabete mellito di tipo II e di insufficienza renale cronica. Studi recenti hanno rivelato una importante complessità, che può essere riassunta in uno schema per cui, mentre valori di GGT superiori alla norma sono diagnostici per danno epatico, valori di GGT all'interno dell'intervallo di riferimento, ma nella parte alta dello stesso hanno valore predittivo nei confronti della malattie cardiovascolari connesse con l'aterosclerosi. Tali

concetti sono ben evidenti in uno studio condotto su una coorte di 283438 soggetti degli ospedali di Vienna (31), utilizzando come analisi di routine il rilevamento di GGT al momento del ricovero o in pazienti esterni e come metodica di screening nel corso dei 13 anni successivi al primo prelievo. Stratificando i pazienti secondo i livelli di GGT, separatamente nei due sessi in:

- 1) normalmente bassi (<9U/L per le donne e <14U/L per gli uomini)
- 2) normalmente elevati (da 9 a 17 U/L per le donne e da 14 a 27 U/L negli uomini)
- 3) moderatamente elevati (da 18 a 26 U/L per le donne e da 28 a 41U/L negli uomini)
- 4) elevati (da 27 a 35 U/L nelle donne e da 42 a 55 U/L negli uomini)
- 5) molto elevati (>35 nelle donne e >55 negli uomini)

La relazione tra GGT e cause di mortalità è stata analizzata mediante l'uso di un modello statistico di regressione multivariata di Cox aggiustata per sesso e per età.

Nonostante la sensibilità del test, l'utilizzo diagnostico della GGT sierica è limitata dalla bassa specificità, poiché i valori enzimatici sono influenzati sia da fattori genetici che ambientali (età, genere, glicemia, colesterolemia, stile di vita condotto, etc...).

- ***GGT totale e il rischio cardiovascolare***

Dai primi studi epidemiologici è emerso che alti livelli di GGT (> 24U/L) sono associati ad un importante aumento di mortalità per cardiopatia ischemica (32); tale aumento risulta più evidente in pazienti con un precedente infarto del miocardio al momento del reclutamento

nello studio. Da qui l'ipotesi dell'esistenza di un collegamento tra GGT sierica e l'evoluzione della malattia aterosclerotica, ulteriormente sostenuta da altri studi effettuati su popolazioni con sindrome ischemica e malattia coronarica accertata e dall'osservazione che la GGT sierica sia associata anche a un'aumentata incidenza di ictus emorragico. E' stata inoltre dimostrata una correlazione positiva fra GGT e i principali fattori di rischio cardiovascolari, come ad esempio la concentrazione dei lipidi nel sangue, l'indice di massa corporea, l'ipertensione, l'intolleranza al glucosio, l'insulino resistenza e lo sviluppo di diabete di tipo II. Livelli di GGT sono correlati, positivamente, anche con nuovi potenziali fattori di rischio emergenti come la proteina C-reattiva, il fibrinogeno e l' F2-isoprostano. Ciò suggerisce che una predisposizione genetica potrebbe essere alla base ed influire sullo sviluppo dell'obesità addominale, sull'insulino resistenza o su altri fattori che entrano in gioco nel promuovere lo sviluppo della sindrome metabolica, e che essa possa anche comprendere un aumento dei valori di GGT o di altri enzimi epatici. Wannamethee et al. (33), furono i primi a focalizzare l'attenzione sull'aumento di mortalità per cardiomiopatia ischemica (IHD). In un ampio studio svolto su 7613 uomini di mezza età affetti da cardiomiopatia ischemica da 11 anni, i livelli di GGT entro i normali limiti di riferimento, erano strettamente associati con tutte le cause di mortalità e l'associazione era largamente dovuta ad un significativo aumento, in morti per IHD, dei valori di GGT nel picco massimo del quintile di distribuzione. Dopo la valutazione di diverse variabili in gioco, come di eventi ischemici, presenza di diabete, di ipertensione, concentrazione totale di HDL e colesterolo, livelli di glucosio nel sangue, è stato rilevato come alti valori di GGT (≥ 24 U/L) siano strettamente correlati con incremento di mortalità per ogni tipo di causa e per cardiomiopatia ischemica. L' aumento della

probabilità di morte cardiaca è più marcata per pazienti con evidenza di IHD, particolarmente per quelli colpiti precedentemente da infarto del miocardio.

Nel 2005 Ruttman e colleghi (34), hanno confermato il valore prognostico delle concentrazioni di GGT nel siero per eventi fatali di forme croniche di malattia coronarica e per manifestazioni cardiache acute; ciò è stato verificato per entrambi i sessi, con una evidente relazione dose-risposta ed una maggiore importanza nei soggetti giovani (età < 60 anni). Il valore soglia per le concentrazioni di GGT per poter differenziare meglio i soggetti a rischio cardiovascolare sono: 28 U/L per gli uomini e 18 U/L per le donne (valori entro l'intervallo di concentrazioni fisiologiche). Da indagini successive è emerso che il valore prognostico dell'attività di GGT è più rilevante nei soggetti giovani e nei diabetici e che le concentrazioni sieriche di GGT sono predittrici indipendenti per l'insorgenza della sindrome metabolica. In tutti gli studi effettuati la GGT continua ad essere un marker prognostico indipendente rispetto alla patologia cardiovascolare anche dopo aver corretto l'analisi statistica per età, genere, consumo di alcol e per gli altri fattori di rischio cardiovascolare noti (fumo, insulino-resistenza, pressione arteriosa, dislipidemia).

- **GGT totale e frazioni nell'aterosclerosi**

La relazione tra GGT sierica e patologia aterosclerotica, è stata confermata in uno studio prospettico della durata di sei anni, in cui sono stati arruolati 469 pazienti con sindrome ischemica e malattia coronarica (CAD) documentata angiograficamente. Dopo la correzione per altri fattori di rischio cardiovascolari (fumo, età, livelli totali di colesterolo nel sangue, frazione di iniezione di sangue da parte del ventricolo sinistro, indice di massa corporea e diabete mellito) o di altri fattori confondenti (alanina amminotransferasi sierica e consumo

giornaliero di alcol) è stato confermato il valore prognostico dell'attività della GGT sierica per morte cardiaca e infarto non fatale. Soprattutto il valore predittivo della GGT sierica è apparso più evidente in un sottogruppo di pazienti nei quali le placche aterosclerotiche sono più soggette a rottura, con aterosclerosi diffusa e precedenti manifestazioni di infarto del miocardio (36 % dell'intera popolazione). Usando due diversi valori soglia della GGT, 25 o 45 U/L, entrambi rientranti all'interno dei limiti di riferimento, si può osservare che il rischio aumenta progressivamente e che la maggior parte degli eventi cardiaci sono concentrati nei primi tre anni dopo il primo infarto. Il significato prognostico dell'enzima risulta associato alla diffusione delle lesioni aterosclerotiche nelle arterie coronariche e, tale valore prognostico, perde di significato in soggetti sottoposti a rivascolarizzazione con angioplastica o by-pass, procedure che portano alla stabilizzazione della placca (35). Questi dati suggeriscono che la prognosi sfavorevole, associata ad elevati valori di GGT sierica, dovrebbe esser valida per quegli individui con placche vulnerabili, e ciò fa pensare ad una associazione tra la GGT ed i processi coinvolti nella destabilizzazione della placca.

Studi di istochimica hanno dimostrato la presenza di GGT in lesioni aterosclerotiche e nell'arteria coronarica e carotidea, e la sua massima attività è stata rilevata a livello dello strato intimale della placca aterosclerotica, all'interno del complesso CD68+ formato da macrofagi e lipoproteine LDL ossidate. Si è notata una stretta correlazione tra cellule GGT positive ed il complesso di lipoproteine ossidate LDL, estremamente immunoreattivo. Inoltre l'attività catalitica di GGT è stata rilevata in microtrombi aderenti alla superficie dell'ateroma. Da ricerche condotte da Stark e colleghi, è emerso come nella placca aterosclerotica è presente glutatione (GSH), substrato della GGT, oltre a depositi di ferro,

lipidi ossidati, ferro redox attivo ed un accumulo di ferritina. In questo contesto la GGT potrebbe indurre il clivaggio del glutatione con conseguente riduzione dello ione ferrico Fe^{3+} a ferroso Fe^{2+} e ciò favorirebbe l'instaurarsi di una serie di reazioni redox pro-ossidanti, ferro-dipendenti, per azione della GGT, con la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), come l'anione superossido, che potrebbero contribuire alla progressione ed alla destabilizzazione della placca aterosclerotica favorendo l'ossidazione delle LDL, ma anche modulando l'attività delle metallo proteasi, la proliferazione e l'apoptosi degli elementi cellulari, l'aggregazione piastrinica e la trombosi (36; 37). La GGT presente nella placca, inoltre, potrebbe avere due origini distinte: una endogena, prodotta dagli elementi della placca come le cellule infiammatorie, ipotesi supportata dalla presenza di mRNA per la GGT (38), ed una esogena derivante dal trasporto dell'enzima dalle lipoproteine come le LDL stesse. Si suppone che l'enzima GGT circolante ritrovato nel siero sia quello di derivazione epatica; valori costitutivamente elevati di GGT si sono osservati in famiglie con tratto ereditario di tipo autosomico dominante; l'importanza dei fattori genetici, e la loro implicazione nella determinazione di tale carattere, è ancora oggetto di dibattito e, dagli ultimi confronti emerge che un insieme di fattori genetici ed ambientali entrano in gioco nel determinare ed influenzare i livelli di GGT sierica. D'altro canto, si è visto come l'incremento dei livelli di GGT osservati nelle placche aterosclerotiche dei pazienti, potrebbe derivare da un aumentato consumo piastrinico. Un recente rapporto, che indica il valore prognostico degli elevati valori di GGT sierica in pazienti sottoposti a rivascolarizzazione angioplastica con stent, sembra supportare il potenziale ruolo delle placche come sorgente di GGT circolante. Significativi livelli di GGT appaiono derivare anche dai granulociti, poiché si è notata una

correlazione tra la conta delle cellule della linea bianca del sangue e le concentrazioni dell'enzima; ciò fa supporre la presenza di una sorgente addizionale dell'enzima circolante.

I dettagli dell'associazione della GGT sono stati studiati su una popolazione di pazienti affetti da CAD, documentata angiograficamente. Sia nei controlli che nei CAD, la quantità di GGT è associata a β -lipoproteine (β -LP), incluse anche le LDL, IDL e le VLDL. Inoltre, sia in questi pazienti che nei controlli, la maggior parte di GGT associata a β -LP è direttamente proporzionale ai livelli di GGT sierica totale. Comunque nei pazienti con CAD la frazione di GGT associata con le β -lipoproteine era significativamente più bassa; fu così proposto che la diminuzione della GGT associata alle β -LP nei CAD potesse essere dovuta o alla riduzione dell'associazione tra la GGT e le LDL o all'aumentato rilascio della GGT dalle LDL, oppure dall'aumentata internalizzazione dei complessi LDL-GGT all'interno della lesione aterosclerotica. In accordo con quest'ultima ipotesi, l'aumentato ingresso dei complessi LDL-GGT, seguito dall'accumulo di GGT dentro la lesione, potrebbe spiegare la già riportata correlazione tra alti livelli di GGT nel siero e le conseguenze cliniche dell'aterosclerosi. Da recenti studi è emerso che la b-GGT è la sola frazione della GGT sierica ritrovata all'interno di placche aterosclerotiche (38) ; la conoscenza in dettaglio delle sue proprietà potrebbe aiutare a chiarire il preciso ruolo della GGT nel processo di patogenesi delle placche aterosclerotiche, e la relazione tra danneggiamento dell'organo, livelli di GGT e rischio individuale di malattia.

1.12 Origine e caratteristiche della GGT sierica e delle frazioni della GGT

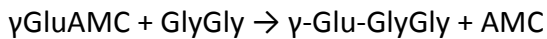
1.12.1 Metodi per la misura delle frazioni della GGT

Esistono diversi metodi per la separazione e quantificazione delle forme circolanti dell'enzima; come tecnica di separazione è stata usata principalmente l'elettroforesi su acetato di cellulosa (22), ma anche su agarosio (23) e poliacrilammide. In letteratura è descritto anche un metodo basato su una cromatografia per esclusione molecolare (24).

Il metodo che è stato più usato per lo studio delle frazioni circolanti di GGT in ambito clinico è sicuramente quello basato sull'elettroforesi in acetato di cellulosa (22). Con questo metodo è possibile rilevare sei frazioni di GGT (Dep-GGT, γ -GGT, β -GGT, α 1-GGT; α 2-GGT e Alb-GGT). Le frazioni α 1- e α 2-GGT sono sempre presenti, le frazioni dep-, γ - e β - GGT sono prevalentemente presenti in epatopatie, mentre la frazione alb-GGT è principalmente presente in pazienti con tumore epatico e /o cirrosi.

Recentemente è stato proposto un nuovo metodo per la separazione e determinazione delle forme molecolari di GGT (25). La determinazione dell'attività delle frazioni di GGT è eseguita con un sistema FPLC utilizzando una colonna per cromatografia ad esclusione molecolare (Superose 6HR 10/300 GL, GE Healthcare) che consente di separare le componenti plasmatiche esclusivamente in base al loro PM in un intervallo compreso tra 5000 e 5 kDa. Perciò è possibile separare anche le molecole legate alle VLDL da quelle legate alle LDL. Per poter determinare in continuo l'attività di GGT, attraverso una connessione a T, all'eluato è continuamente aggiunta una soluzione contenente γ - glutammil-7-amido-4-metilcumarina (γ GluAMC), substrato fluorescente specifico per la GGT. La miscelazione dell'eluato dalla colonna con il substrato della GGT avviene in una spira con volume di 2,6 mL

(corrispondente ad un'incubazione di circa 4 min) posta in un bagno termostatico a 37 °C. Poiché l'accettore della reazione di transpeptidazione è incluso nella fase mobile, la presenza dell'enzima è visualizzata attraverso la liberazione del composto fluorescente amminometilcumarina (AMC) secondo la reazione:



Il prodotto AMC è rilevato tramite un fluorimetro operante a una lunghezza d'onda di eccitazione di 380 nm e di emissione di 440 nm. Le condizioni di reazione sono tali per cui l'area sottesa ai picchi è proporzionale all'attività enzimatica presente; il limite di rivelazione dell'attività è pari a 0,5 U/L. Il principale svantaggio di questo metodo è il tempo necessario per una determinazione, che è di circa 50 min. Con questo metodo è stata caratterizzata la distribuzione delle forme molecolari di GGT in 200 soggetti sani, donatori di sangue (100 uomini e 100 donne) (26). In tutti i soggetti sono state identificate quattro forme di GGT, denominate big-GGT (b-GGT, 2000 kDa), medium-GGT (m-GGT, 940 kDa), small-GGT (s-GGT, 140 kDa) e free-GGT (f-GGT, 70 kDa). I PM delle frazioni b-, m- e s-GGT sono compatibili con quelli di complessi con le lipoproteine VLDL, LDL, HDL, rispettivamente, mentre quello di f-GGT è indicativo di una forma enzimatica libera. Il PM delle singole frazioni è indipendente dai livelli di GGT associati ad esse; ciò suggerisce l'esistenza di un'interazione specifica tra l'enzima e il trasportatore piuttosto che un adsorbimento casuale in circolo. E' perciò possibile che la secrezione e la rimozione delle singole frazioni siano indipendenti l'una dall'altra. Analizzando l'andamento dell'attività delle quattro frazioni in funzione dell'attività totale di GGT, è emerso che tutte e quattro le frazioni di GGT presentano valori più elevati nei maschi rispetto alle donne (**Tabella 1.3**) e che in entrambi i generi f-GGT è la frazione più

rappresentata alle basse concentrazioni di GGT totale (<20 U/L), mentre l'aumento di questa dipende principalmente dalle frazioni s- e b-GGT (**Fig. 1.4**). Un altro aspetto che distingue f-GGT dalle frazioni ad alto PM è la forma della distribuzione di frequenza nella popolazione, gaussiana per f-GGT e asimmetrica a destra, come per la GGT totale, per le altre tre (25;26).

Tabella 1.3: Attività plasmatica di GGT totale e sue frazioni in soggetti sani. (26)

	Maschi		Femmine		P
	Mediana	5°-95° percentile	Mediana	5°-95° percentile	
GGT Totale	25.3	12.3-60.5	14.4	8.4-30.9	<0.001
b-GGT	2.4	0.7-10.7	1.1	0.4-5.2	<0.0001
m-GGT	1.0	0.2-3.3	0.5	0.2-1.2	<0.0001
s-GGT	9.2	2.8-33.7	3.9	1.5-11.6	<0.0001
f-GGT	13.2	8.3-19.6	8.9	5.9-12.5	<0.0001
b-GGT/s-GGT	0.29	0.12-0.58	0.28	0.13-0.67	<0.0001

I dati sono espressi in U/L

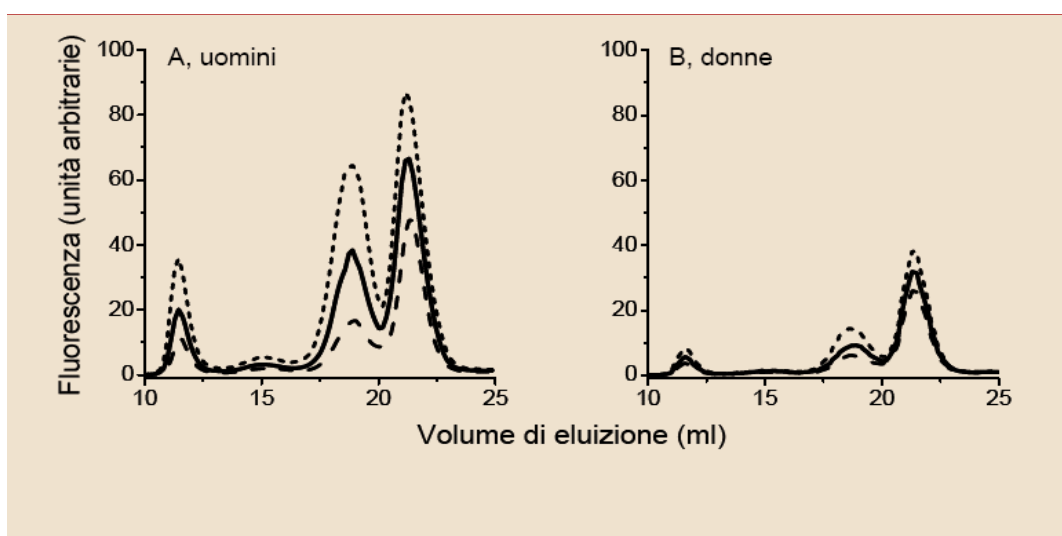


Figura 1.4: Profili di eluizione delle frazioni plasmatiche di GGT in una popolazione di soggetti sani A) uomini (n=100), B) donne (n=100). I cromatogrammi rappresentano l'andamento del 25° (linea tratteggiata), del 50° (linea punteggiata) e del 75° (linea continua) percentile del segnale fluorescente registrato ad ogni volume di eluizione (25;26).

1.12.2 Caratteristiche chimico-fisiche della GGT sierica e delle sue frazioni

Nonostante il frequente uso clinico e diagnostico, le conoscenze sull'origine tissutale della GGT sierica e sui meccanismi di secrezione e rimozione dal circolo sono frammentarie. La GGT sierica sembra essere di origine epatica come suggerito da studi condotti da Huseby e collaboratori nel 1981, dai quali è emerso che la GGT presente nel siero mostra le stesse caratteristiche di quella estratta dal fegato per quel che riguarda il PM, il contenuto di residui di acido sialico ed il grado di glicosilazione. Questi parametri risultano essere diversi rispetto a quelli della GGT purificata dalle urine, dal rene e dal pancreas. Studi successivi hanno dimostrato la presenza di due diverse frazioni di GGT nel siero, una idrofilica ed una idrofobica, che differiscono per carica, dimensioni e densità. La frazione idrofobica è costituita da un insieme di complessi molecolari, che sono formati dalle lipoproteine sieriche VLDL, LDL, HDL e chilomicroni le quali molto probabilmente trasportano la GGT. Si suppone che l'associazione tra le lipoproteine e la GGT avvenga tramite il dominio lipofilico localizzato all'estremità N-terminale della catena pesante della GGT, che normalmente è responsabile della normale inserzione dell'enzima nella membrana plasmatica. La forma idrofilica invece, apparentemente identica a quella ottenuta dopo il trattamento proteolitico usato per la purificazione della GGT dal tessuto, sembra circolare nel sangue come enzima libero (27;28;29). La porzione idrofilica costituisce circa il 60-70 % dell'attività totale in soggetti normali, ma solo il 15-30 % in soggetti con malattie epatiche, nei quali si osserva un forte aumento della componente idrofobica probabilmente costituito da enzima associato con le lipoproteine plasmatiche. L'associazione dell'enzima GGT con le lipoproteine è stata studiata da Huseby e collaboratori (1982) nel siero di pazienti con patologie epatobiliari. E' stato

osservato che il 60-80% dell'attività totale della GGT è idrofobica, legata in complessi con le lipoproteine. In questi studi mediante cromatografia per esclusione molecolare è stato possibile visualizzare tre picchi di attività: il I° picco con PM di circa 1000 KDa, il II° picco con PM compreso tra 250-450 KDa, il III° picco corrispondente all'enzima libero e solubile. I complessi costituiti dalla parte idrofobica della GGT con le lipoproteine, possono essere separati in due principali frazioni mediante cromatografia per gel di filtrazione o elettroforesi in gel di agarosio. Successive indagini hanno permesso di stabilire che nel picco I veniva eluita attività di GGT associata alle VLDL e alle LDL, in quanto questi complessi presentavano mobilità β in elettroforesi in gel di agarosio, densità minore di 1,060 ed erano precipitabili con polianioni insieme alle β -lipoproteine (VLDL e LDL). Il picco II, diversamente, sembra essere formato da GGT associata alle lipoproteine HDL; infatti, l'attività enzimatica raccolta in questo picco presenta mobilità $\alpha_1\alpha_2$, densità compresa tra 1,06 e 1,22 ed era precipitabile con polianioni assieme alle HDL. La GGT sierica è quindi un insieme eterogeneo di complessi o frazioni solo in parte caratterizzati nella struttura e nella composizione, per i quali è ancora sconosciuto il meccanismo di rilascio in circolo. Si pensa che le forme ad alto peso molecolare possano essere costituite da GGT associata a lipoproteine o a frammenti di membrana plasmatica, derivanti dagli epatociti. Nel corso dei diversi studi condotti per valutare l'associazione delle lipoproteine plasmatiche con le frazioni di GGT, è emersa un'inaspettata complessità delle frazioni della GGT sierica, infatti, sebbene ognuna delle procedure di separazione utilizzate (cromatografia, ultracentrifugazione, precipitazione selettiva con polianioni) abbia dimostrato un discreto grado di analogia tra il comportamento delle tre forme di GGT con maggiore peso molecolare (b-GGT, m-GGT, s-GGT) e le lipoproteine circolanti VLDL, LDL, HDL, nessuna di queste tre frazioni ha mostrato

un comportamento esattamente identico a quello delle lipoproteine corrispondenti per peso molecolare. Questi dati ricavati mettono in dubbio quanto finora accettato, e cioè che le lipoproteine circolanti siano i veicoli per la GGT, altrimenti troppo idrofobica per poter circolare in forma libera. Così mediante l'analisi delle proprietà fisiche (dimensione, densità, condizioni di sedimentazione mediante centrifugazione) e della sensibilità delle frazioni plasmatiche di GGT alla proteasi papaina e al detergente acido desossicolico, è stato possibile approfondire lo studio sulla caratterizzazione di tali frazioni dal quale è emerso che queste potrebbero avere una struttura e un'origine diversa. La frazione b-GGT ha dimostrato di avere un peso molecolare corrispondente alle VLDL ma densità corrispondente alle HDL, che non sono altro che la dimensione e la densità degli esosomi. Essa si comporta come GGT inserita nella membrana plasmatica poiché risulta sensibile all'azione della papaina solo dopo trattamento con detergenti; infine è recuperata con gli esosomi dal plasma. Questi risultati hanno consentito di ipotizzare che codesta frazione potesse essere parte integrante degli esosomi o di micro-particelle, vescicole di membrana secrete nell'ambiente extracellulare mediante meccanismi attivi e regolati. Le vescicole di membrana rilasciate nell'ambiente extracellulare sono particolarmente arricchite in "raft" di colesterolo, specifici domini della membrana plasmatica nei quali sono presenti proteine coinvolte nella trasduzione del segnale. La GGT nella membrana plasmatica è presente nei raft di colesterolo in associazione con la tetraspanina CD81, una proteina normalmente presente anche negli esosomi o nelle micro-particelle. E' stato osservato, inoltre, che la frazione b-GGT viene anche rilasciata nel mezzo di coltura da cellule umane di origine non-epatica, come cellule di melanoma, di carcinoma alla prostata e del normale epitelio bronchiale e ciò suggerisce che la b-GGT potrebbe derivare in parte da membrane cellulari di origine epatica.

Da studi condotti di recente è stato anche individuato un profilo di eluizione delle frazioni di GGT alterato in alcuni pazienti affetti da tumori, caratterizzato dalla presenza di una pre-b-GGT con peso molecolare maggiore della frazione b-GGT. Le caratteristiche del complesso macromolecolare presente in questa pre-b-GGT sembra essere compatibile con l'ipotesi che sia costituito da micro-particelle. Tale ipotesi può essere supportata dal fatto che cellule tumorali rilasciano esosomi e microparticelle nell'ambiente extracellulare, e che i *pathway* ontogenetici siano in grado di guidare la produzione di microvescicole oppure stimolarne la sintesi da parte delle stesse cellule tumorali. Quindi b-GGT potrebbe originare da membrane ricche in GGT sia di origine epatica che extraepatica; essa avrebbe così un'origine tissutale diversa rispetto alle altre frazioni ed il fatto che il meccanismo di secrezione della GGT sia tessuto specifico, porterebbe a spiegare le diversità strutturali e di carica superficiale di b-GGT rispetto a m-GGT e s-GGT. Le frazioni m- e s-GGT contengono la proteina GGT completa del peptide idrofobico N-terminale, che ne rende possibile l'associazione con i trasportatori plasmatici, e hanno mostrato un comportamento compatibile con la presenza in esse di micelle costituite da acidi biliari e GGT. Contrariamente a quanto osservato per la b-GGT, non è stato possibile individuare una sorgente di m-GGT e s-GGT, anche se quest'ultima è stata ricavata in seguito ad una serie di modifiche della frazione b-GGT in diverse condizioni sperimentali (mediante trattamento del plasma con acido desossicolico). Infine la frazione f-GGT corrisponde alla forma libera dell'enzima priva del peptide idrofobico N-terminale. E' la frazione più rappresentata nel plasma dei soggetti sani. E' emerso inoltre che le forme di GGT ad alto peso molecolare presentano una diversa carica superficiale ed affinità per il substrato (γ -glutammina-7-amido-4-metilcumarina (GluAMC), substrato fluorescente specifico per la GGT) rispetto alla forma libera f-GGT, questo potrebbe esser dovuto all'influenza dei

trasportatori plasmatici sull'enzima GGT che quindi potrebbero influenzare la cinetica enzimatica dell'enzima ad esso legato, ma anche i meccanismi di rilascio e rimozione dal circolo.

1.13 GGT totale e frazioni nel danno epatico

L'enzima GGT è stato scoperto ed adoperato in clinica già a partire dagli anni 1960 e 1970 come test di funzionalità epatica o come saggio dell'attività enzimatica nel fegato. Le prime documentazioni raccolte da Szczeklik et al. (19) hanno riportato una serie di valori medi in differenti tipi di disfunzioni epatiche ed hanno mostrato diversi casi in cui i livelli di GGT sierica si sono modificati nel corso del tempo rispetto ai valori di altri enzimi epatici che, invece, sono rimasti pressoché invariati. Nonostante la sensibilità del test, rimane difficile, nella maggior parte dei pazienti con patologie epatiche, andare a ricercare le cause fisiopatologiche di base ed il loro grado di correlazione con la GGT. Il problema maggiore consiste appunto nella bassa specificità che il test ha, data la moltitudine di patologie o di altre condizioni presenti (pancreatite, diabete, obesità, esercizio fisico, eccessivo consumo di alcol, uso di droghe che promuovono l'attività enzimatica) che possono indurre un aumento dei valori di GGT. Nella steatopatia non alcolica (NASH), una malattia epatica associata a diabete e obesità ma che mostra anche alcune caratteristiche con le disfunzioni epatiche alcol derivate, i livelli di GGT aumentano nella maggior parte dei pazienti. Il principale interesse in relazione alla GGT è che la NASH presenta le stesse manifestazioni delle degenerazioni epatiche d'origine alcolica e questo potrebbe rappresentare una condizione estrema dell'associazione epidemiologica tra GGT ed obesità, insulino-resistenza, diabete e fegato steatosico. Un'ultima ricerca effettuata da Hickam PE et al. (1994) sulla GGT rileva come essa sia un utile indicatore di rigetto di trapianto del fegato, anche se la singola misura dei suoi valori risulta insufficiente. Studi più dettagliati effettuati per approfondire la natura,

l'origine tissutale ed il destino metabolico delle frazioni delle GGT, renderanno possibile una maggiore conoscenza del loro meccanismo d'azione ed il loro coinvolgimento nelle diverse patologie. Infatti tali dati confrontati con i risultati ottenuti sullo studio delle frazioni di GGT in quadri clinici ben definiti, rappresenteranno le basi per definire il ruolo delle frazioni di GGT come specifici biomarcatori di patologie epatiche, metaboliche e cardiovascolari. Notevole importanza assumono in particolare le frazioni b-GGT ed s-GGT come biomarcatori di screening diagnostico preventivo, per l'analisi differenziale di due grandi patologie epatiche, la steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e l'epatite virale C (CHC). Si è visto come in soggetti affetti da NAFLD l'incremento della GGT totale è dovuto maggiormente ad incremento della frazione b-GGT, mentre nei soggetti con CHC predomina la frazione s-GGT. Ciò suggerisce come b-GGT svolga un ruolo prognostico più specifico e sensibile per la diagnosi della NAFLD, a differenza della frazione s-GGT che risulta più efficace per la diagnosi di pazienti affetti da CHC; il rapporto delle frazioni b/s mostra grande specificità e risulta particolarmente utile per la diagnosi differenziale tra NAFLD e CHC (**Tabella 1.4**). (39).

	NAFLD (N=90)	CHC (n=45)	HS (n=70)
Total-GGT	39.4(20.0-82.0)	41.5(21.9-84.5)	18.4(13.2-24.9)
b-GGT	5.1(2.5-14.9)	2.1(1.2-5.3)	1.7(1.0-2.4)
m-GGT	1.7(0.6-3.7)	1.2(0.4-3.7)	0.6(0.4-0.9)
s-GGT	14.9(5.9-43.5)	22.9(10.0-59.6)	4.7(2.9-8.9)
f-GGT	14.2(10.3-18.6)	13.8(9.3-16.9)	9.9(8.4-12.2)
b/s ratio	0.37(0.24-0.51)	0.10(0.07-0.15)	0.32(0.22-0.48)

Tabella 1.4: Attività della GGT totale e delle sue frazioni in pazienti con Steatosi epatica non alcolica(NAFLD),epatite cronica C(CHC) e in soggetti sani(HS) (Franzini et al., 2012). I valori sono espressi come mediana (25°-75° percentile).

2. SCOPO DELLA TESI

Nonostante siano stati realizzati molti progressi negli esami del sangue per la diagnosi delle malattie trasmissibili con le donazioni di sangue, il rischio della trasmissione di patologie virali, batteriche e parassitarie esiste ancora. Per questo, le complicanze infettive della trasfusione restano un importante argomento di attenzione per la Medicina Trasfusionale (1). Tra i virus potenzialmente trasmissibili con le trasfusioni di sangue ritroviamo anche i virus per l'epatite B e C. L'epatite è un'inflammatione del fegato che può essere causata da numerose tossine, da processi immunologici oppure da agenti infettivi. L'epatite correlata alla trasfusione è quasi esclusivamente determinata da virus. Gli agenti infettivi costituiscono una seria minaccia per i riceventi, se persistono nel circolo di donatori di sangue asintomatici, e sono in grado di causare nei riceventi malattie acute o croniche di rilevanza clinica. Le epatiti post-trasfusionali causate dai virus HBV e HCV, sono in grado di determinare nei donatori un quadro stabile di portatore caratterizzato da un elevato titolo viremico in assenza dei sintomi clinici.

Secondo la normativa vigente in Italia, ogni qual volta si effettua una donazione di sangue, il donatore viene obbligatoriamente sottoposto ad esami di laboratorio volti ad escluderne la positività degli indicatori delle malattie trasmissibili. Tra questi esami ritroviamo il test per l'HBs Ag e il test HCV Ab. Ovviamente, ogni donazione deve risultare negativa a tali test per poter essere considerata valida. In base al risultato ottenuto in seguito all'applicazione dei test di cui sopra, si interpreta il risultato come *Negativo* oppure come *Reattivo*. Un campione *Reattivo* è un campione i cui risultati per i test di screening (HBs Ag e HCV Ab) risultano fuori norma, nonostante il test per verificare la presenza di DNA o RNA virale (test NAT) sia

risultato assolutamente negativo. Una donazione proveniente da un donatore risultato reattivo a tali test non può essere utilizzata a fini medici e deve essere eliminata, nonostante il paziente non possa considerarsi affetto da epatite B o C. Ci si trova così di fronte ad un problema di gestione di tali donatori e delle relative donazioni di sangue: è necessario comunicare al donatore la non validità della donazione avendo cura di non creare allarmismi.

In clinica, dal 1961 la determinazione dell'attività enzimatica della GGT nel siero viene utilizzata come marcatore diagnostico di funzionalità epatica (19); ad esempio, l'elevazione di GGT sierica può essere riscontrata in pazienti con epatopatia cronica conseguente all'infezione da HCV; da qui l'idea del presente lavoro di tesi che ha come scopo quello di valutare le varie frazioni di GGT, utilizzando la tecnica della cromatografia per esclusione molecolare, in una serie di campioni di sangue risultati reattivi per valutare se esistono differenze significative tra tali valori e i valori delle varie frazioni ritrovati in una serie analoga, per numero e sesso, di controlli negativi ai test di screening e una serie proveniente invece da pazienti effettivamente positivi ai test NAT per la presenza di genoma virale e/o al test per la ricerca di anticorpi contro il virus.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Raccolta dei campioni

I campioni analizzati in questo studio provengono da donatori di sangue che hanno effettuato la donazione presso le tre sedi (Lucca, Barga e Castelnuovo di Garfagnana) della struttura complessa di Medicina Trasfusionale e Immunoematologia dell'azienda ASL 2 di Lucca.

3.1.1 Criteri di classificazione

I campioni *Reattivi* provengono da donatori di sangue risalenti al periodo che va dal 13/04/2011 al 01/03/2013. Al momento della donazione tali donatori sono risultati essere REATTIVI al test per l'HBs Antigene o al test HCV Ab. Le unità di sangue ed emocomponenti provenienti da tali donatori sono state eliminate in base ai requisiti previsti dalla normativa vigente nonostante il donatore non possa considerarsi affetto da epatite B o C.

I campioni utilizzati come *Controlli Negativi* provengono da donatori di sangue e risalgono al periodo che va dal 11/07/2012 al 15/07/2012. Al momento della donazione tali donatori sono risultati essere NEGATIVI al test per l'HBs Antigene e al test HCV Ab. Le unità di sangue ed emocomponenti provenienti da tali donatori sono risultate idonee ed utilizzate normalmente a scopo trasfusionale.

I campioni *Positivi* provengono, invece, da pazienti esterni o ricoverati nell'ospedale di Lucca e risalgono al periodo che va dal 13/11/2012 al 02/08/2013. Al momento del prelievo tali pazienti sono risultati essere POSITIVI alla ricerca di RNA di HCV e/o al test HCV Ab.

3.2 Test utilizzati:

I test per la validazione delle unità di sangue sono eseguiti presso il CQB (Centro di Qualificazione Biologica) che, nell'area vasta Nord-Ovest è situato presso l'Azienda Ospedaliera Pisana e esegue i test di sierologia virale e test NAT per i Servizi Trasfusionali di Livorno, Pisa, Massa e Lucca. Pertanto i test in oggetto sono stati effettuati in quella sede.

3.2.1 Test di screening sierologico

Rientrano tra i test di screening il test per l'HBsAg e il test HCV Ab. Sono entrambi metodi immunoenzimatici. L'enzimoimmunologia comprende tutte quelle tecniche immunologiche nelle quali il rilevatore è costituito da un antigene o un anticorpo marcato con un enzima; il grado di legame fra il reagente marcato ed il suo immunoreattivo, e quindi la concentrazione della sostanza oggetto del dosaggio che con tale reagente è in competizione, viene calcolato mediante la misura dell'attività enzimatica. L'enzimoimmunologia può essere classificata in omogenea ed eterogenea:

a) Con enzimoimmunologia omogenea si indica quel metodo nel quale l'enzima nel composto marcato (antigene o anticorpo) si comporta in maniera diversa a seconda che questi sia o non sia legato al suo immunoreagente; in questo caso, quindi, i reagenti, una volta avvenuta la reazione, non hanno più necessità di essere separati in due frazioni (libera e legata) e si può misurare l'attività enzimatica direttamente sulla miscela di reazione.

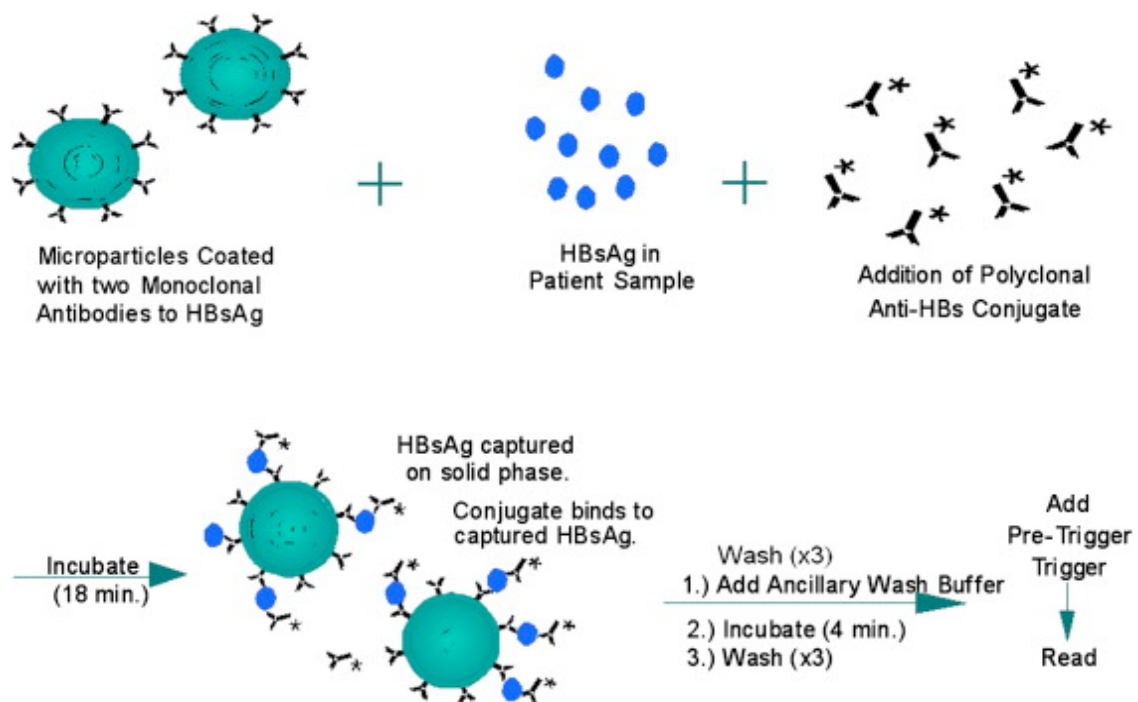
b) L'enzimologia eterogenea comprende invece quei casi nei quali l'enzima con il quale il reagente è marcato non modifica la sua attività nel passare dallo stato libero a quello legato, e nei quali, quindi, viene richiesta la separazione fisica delle frazioni "libera" e "legata". Per indicare questa tecnica, nel caso che la separazione della frazione avvenga grazie all'assorbimento di uno degli immunoreattivi su fase solida, si usa il termine ELISA. (*Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay*) (40)

3.2.1.1 Il metodo per l'HBsAg

Il test di screening usato per valutare la presenza dell'antigene di superficie del virus dell'epatite B nelle donazioni è un metodo qualitativo: ARCHITECT HBsAg Qualitative II. E' un saggio di chemiluminescenza (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay - CMIA*) ovvero una tecnica nella quale l'antigene o l'anticorpo è legato ad una molecola capace di emettere luce durante una reazione chimica: questa luce è usata per misurare la formazione del complesso antigene-anticorpo. La luminescenza consiste fondamentalmente nell'emissione di radiazioni luminose nel visibile o nel vicino visibile (lunghezza d'onda nell'intervallo 300-800 nm) dopo che elettroni eccitati mediante una qualche fonte di energia, ritornano dallo stato eccitato a quello fondamentale. L'energia potenziale delle transizioni elettroniche all'interno degli atomi o delle molecole viene così liberata sotto forma di luce. La chemiluminescenza, nello specifico, vede come fonte energetica responsabile dello stato elettronicamente eccitato una reazione chimica esoergonica.

Nel saggio ARCHITECT HBsAg Qualitative II, il campione, le microparticelle ricoperte dagli anticorpi contro l'antigene di superficie (anti-HBs) e gli anti-HBs coniugati alla sostanza chemiluminescente (acridinio) sono uniti per creare una miscela di reazione (41) (**Fig. 3.1**). L'antigene di superficie presente nel campione si lega così agli anti-HBs presenti sulle microparticelle e agli anti-HBs coniugati all'acridinio. Dopo una serie di lavaggi e l'aggiunta di varie soluzioni, la risultante reazione chemiluminescente è misurata come Unità di Luce Relativa (RLUs). Esiste una relazione diretta tra l'ammontare di HBsAg presente nel campione e l'RLU rilevata dal sistema ottico. La presenza o assenza di HBsAg nel campione è determinata confrontando il segnale chemiluminescente della reazione al segnale di *cutoff* (valore soglia) rilevato tramite una procedura di calibrazione. Se il segnale chemiluminescente del campione è maggiore o uguale al segnale di *cutoff*, il campione è considerato REATTIVO per l'HBsAg.

Figura 3.1: Il saggio ARCHITECT HBsAg Qualitative II.



Il sistema ARCHITECT calcola il risultato finale del saggio usando il rapporto tra il valore RLU del campione e il valore RLU del *cutoff*:

- $S/CO = \text{Sample RLU} / \text{Cutoff RLU}$

Interpretazione dei risultati:

ARCHITECT HBs AG Qualitative II INITIAL RESULT

Initial Result Instrument Interpretation Retest Procedure

<1.00

NON-REACTIVE

No retest required

≥ 1.00

REACTIVE

Retest in duplicate

I campioni risultati Reattivi richiedono di essere testati nuovamente e l'interpretazione dei risultati sarà la seguente:

ARCHITECT HBs AG Qualitative II RETEST RESULTS

Instrument Interpretation Specimen Classification

Both results NON-REACTIVE Specimen considered NEGATIVE for HBs AG

One or both results REACTIVE

Specimen considered repeatedly reactive:



Confirm using a different assay

(41)

3.2.1.2 Il metodo per gli anti-HCV

Il test di screening usato per valutare la presenza dell'antigene di superficie del virus dell'epatite C nelle donazioni è un metodo qualitativo: ARCHITECT Anti-HCV . La presenza di anti-HCV indica che l'individuo può essere stato infettato da HCV, può essere portatore infetto di HCV, e/o può essere capace di trasmettere l'infezione da HCV. Sebbene la maggior parte degli individui affetti possa essere asintomatica, l'infezione da HCV può evolvere in epatite cronica, cirrosi e/o aumentato rischio di carcinoma epatocellulare. L'ARCHITECT Anti-

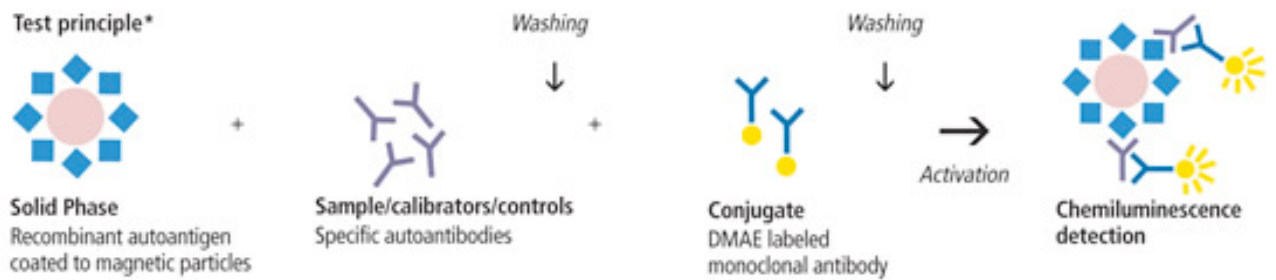
HCV è un saggio di chemiluminescenza (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay* - CMIA) ed è stato sviluppato per individuare anticorpi contro proteine strutturali e non strutturali trascritte a partire dal genoma di HCV (42). Nel primo passaggio il campione da analizzare, le microparticelle ricoperte dagli antigeni ricombinanti del virus e un diluente vengono mischiati (**Fig. 3.2**). Gli antigeni ricombinanti presenti nel kit ARCHITECT Anti-HCV sono:

- HCr43: la proteina HCr43 è espressa in *Escherichia coli* ed è composta da due regioni codificanti non contigue della sequenza genomica di HCV. La prima regione rappresenta gli aminoacidi 1192-1457 (33c) della sequenza HCV. La seconda delle due regioni rappresenta gli aminoacidi 1-150 (core) della sequenza HCV. A causa della somiglianza dell'organizzazione genomica dei *Flavivirus* (a cui appartiene HCV), è stato suggerito che la prima sequenza sia parte della regione codificante NS3 mentre la seconda sequenza provenga dalla regione codificante il core di HCV
- c100-3: l'antigene c100-3 è una proteina HCV ricombinante espressa in *Saccaromyces cerevisiae* (lievito). L'organizzazione genomica dei *Flavivirus* suggerisce che la sequenza clonata è contenuta tra la regioni non-strutturali NS3 e NS4 del genoma di HCV. La proteina c100-3 è una proteina chimerica costituita da 154 aminoacidi provenienti dall'enzima umano superossidodismutasi (hSOD), 5 aminoacidi di legame, gli aminoacidi che vanno dal 1569 al 1931 del genoma HCV e altri 5 aminoacidi di legame alla regione carbossi-terminale.

Gli anticorpi anti-HCV presenti nel campione da analizzare si legheranno alle microparticelle rivestite dagli antigeni di cui sopra. Dopo un lavaggio vengono aggiunti gli anti-HCV coniugati alla sostanza chemiluminescente (acridinio) in quello che è il secondo *step* della procedura.

Dopo un altro lavaggio e l'aggiunta di varie soluzioni, la risultante reazione chemiluminescente verrà misurata in Unità di Luce Relativa (RLUs) (42) (**Fig. 3.2**).

Figura 3.2: Il saggio ARCHITECT Anti-HCV.



*if not otherwise stated on instructions for use

Esiste una relazione diretta tra l'ammontare degli anti-HCV presenti nel campione e il valore di RLU percepito dal sistema ottico del macchinario. La presenza o l'assenza di Ab anti-HCV nel campione è determinata paragonando il segnale chemiluminescente della reazione al segnale di *cutoff* (*valore soglia*) rilevato tramite una procedura di calibrazione. Se il segnale chemiluminescente del campione è maggiore o uguale al segnale di *cutoff*, il campione è considerato REATTIVO per gli Ab anti-HCV.

Il sistema ARCHITECT calcola il risultato finale del saggio usando il rapporto tra il valore RLU del campione sul valore RLU del *cutoff*:

- $S/CO = \text{Sample RLU}/\text{Cutoff RLU}$

Interpretazione dei risultati:

- I campioni che hanno un valore $S/CO < 1.00$ sono considerati NON-REATTIVI e non hanno bisogno di essere testati ulteriormente.
- I campioni con un valore $S/CO \geq 1.00$ sono considerati REATTIVI
- Tutti i campioni inizialmente reattivi devono essere testati nuovamente in duplicato (re-test). Se entrambi i valori dei re-test risultano non-reattivi, il campione deve essere considerato NON-REATTIVO per gli Ab contro l'HCV. Se entrambi i valori dei re-test risultano reattivi, il campione deve essere considerato RIPETUTAMENTE REATTIVO per gli Ab anti-HCV.
- I campioni ripetutamente reattivi per gli anti-HCV dovranno essere ulteriormente analizzati con ulteriori test e saggi supplementari di conferma. (42)

3.2.1.3 I metodi NAT (Nucleic Acid Testing)

Tra i test di screening ritroviamo anche i NAT test (HCV-RNA, HBV-DNA). Nello specifico il PROCLEIX ULTRIO Plus Assay è un test di amplificazione qualitativa in vitro degli acidi nucleici per il rilevamento dell'RNA del virus dell'epatite C (e anche del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1, HIV-1) e/o del DNA del virus dell'epatite B nei campioni di plasma e siero di donatori umani, testati singolarmente o in pool.

Con l'introduzione di test di amplificazione basati sugli acidi nucleici si è riusciti a ridurre il rischio di infezione in seguito a trasfusione di sangue. Nello specifico, con l'introduzione di test NAT per l'HCV RNA è stato ridotto di circa 59 giorni il tempo di rilevamento dell'infezione da HCV, rispetto all'utilizzo del solo test corrente basato su anticorpi. Per quanto riguarda l'HBV DNA, il suo rilevamento tramite test NAT, consente di ridurre di varie

settimane il tempo di rilevamento dell'infezione da HBV rispetto al rilevamento dell'HBs Ag. L'introduzione del NAT per HIV-1, HCV e HBV ha sicuramente migliorato la sicurezza del sangue.

Il PROCLEIX ULTRIO Plus Assay utilizza la tecnologia delle sonde di acidi nucleici per l'amplificazione del *target* per il rilevamento di HIV-1 RNA, dell'HCV RNA e dell'HBV DNA. Il test contiene reagenti che possono essere utilizzati per rilevare i tre virus contemporaneamente o i singoli virus: HIV-1, HCV e HBV. I PROCLEIX Assay includono un controllo interno per il monitoraggio delle prestazioni del test per ogni singolo campione.

Il PROCLEIX ULTRIO Plus Assay prevede tre operazioni che hanno luogo in una stessa provetta: preparazione del campione, amplificazione del *target* HIV-1 RNA, HCV RNA e HBV DNA mediante amplificazione mediata da trascrizione (*Transcription-Mediated Amplification*, TMA) e rilevamento dei prodotti di amplificazione (amplicone) mediante analisi con protezione dell'ibridizzazione (*Hybridization Protection Assay*, HPA).

Durante la preparazione del campione, l'RNA e il DNA vengono isolati dai campioni mediante cattura del *target*. Il campione viene trattato con un detergente per solubilizzare la membrana virale, denaturare le proteine e rilasciare RNA e/o DNA genomico virale. Gli oligonucleotidi ("oligonucleotidi di cattura") omologhi a regioni altamente conservate dei virus HIV-1, HCV e HBV vengono ibridati con il *target* HIV-1 RNA o HCV RNA o HBV DNA, se presente, nel campione analizzato. Il bersaglio ibridato viene quindi catturato su microparticelle magnetiche le quali vengono separate dal plasma mediante un campo magnetico. Per la rimozione dei componenti plasmatici dalla provetta di reazione, si eseguono lavaggi successivi. La separazione magnetica e le operazioni di lavaggio vengono

e eseguite tramite un sistema dedicato, denominato TCS (*Target Capture System*). L'amplificazione del *target* viene eseguita mediante TMA, un metodo di amplificazione degli acidi nucleici mediata da trascrizione che utilizza due enzimi, trascrittasi inversa MMLV e T7 RNA polimerasi. La trascrittasi inversa viene utilizzata per generare una copia del DNA (contenente una sequenza di promotori per la T7 RNA polimerasi) della sequenza *target*. La T7 RNA polimerasi produce molteplici copie di amplicone dell'RNA dal DNA stampo. In questo modo vengono amplificate regioni di HIV-1 RNA, di HCV RNA e di HBV DNA. Il rilevamento viene ottenuto mediante HPA utilizzando sonde di acido nucleico a filamento singolo con marcatura chemiluminescente complementare all'amplicone. Le sonde di acido nucleico marcate ibridano specificamente con l'amplicone. Per distinguere tra sonde ibridate e non, viene impiegato un reagente di selezione che innesca un processo di idrolisi delle sonde "non protette" dal legame con l'acido nucleico. Durante la fase di rilevamento, il segnale chemiluminescente prodotto dalla sonda ibridizzata viene misurato mediante un luminometro ed espresso in Unità di Luce Relativa (RLU).

3.2.2 I test di conferma

3.2.2.1 Il test INNO-LIA HCV Score

Il test è di tipo immunoenzimatico su striscia e si tratta di un test per la determinazione di anticorpi diretti contro il virus dell'epatite C umana. Può essere eseguito su siero o su plasma e il suo uso è previsto come test supplementare da effettuare su quei campioni di siero o di plasma umani risultati reattivi alla normale procedura di *screening* effettuata con il test anti-

HCV. Come appena citato si tratta di un test immunoenzimatico su striscia di terza generazione che incorpora antigeni HCV derivati dalla regione del core, dalla regione ipervariabile E2(HVR), dalla regione elicasi NS3, dalle regioni NS4A, NS4B e NS5A (**Fig. 3.3**).

Gli antigeni sono stati immobilizzati in sei bande su strisce di nylon adese ad un supporto plastico. In aggiunta sono fissate su ogni striscia quattro bande di controllo: la banda di controllo della streptavidina, un controllo positivo 3+ (anti-Ig umane), un controllo positivo 1+ (IgG umane) e una banda cut-off \pm (IgG umane).

Un campione diluito è incubato in una vaschetta insieme ad una striscia. Se presenti nel campione, gli anticorpi HCV si legheranno alle bande antigeniche HCV presenti sulla striscia. Successivamente viene aggiunto un coniugato di fosfatasi alcalina marcato con anti IgG umane in grado di legarsi con i complessi specifici HCV antigene/anticorpo, se precedentemente formati. L'incubazione con l'enzima substrato produce un colore marrone, la cui intensità è proporzionale alla quantità di anticorpi HCV-specifici catturati dal campione su ogni banda specifica. Lo sviluppo del colore viene bloccato con acido solforico.

La procedura consiste nell'utilizzare una vaschetta per ciascun campione, tenendo conto di aggiungere una vaschetta per il Controllo Positivo e una vaschetta per il Controllo negativo. Ad ogni vaschetta, adeguatamente identificata, viene aggiunto 1 ml di *Diluente del campione* e un'aliquota di campione o di controllo. Viene poi aggiunta una striscia ad ogni vaschetta, facendo attenzione che sia completamente immersa. I campioni sono incubati su un agitatore per 16 ore a temperatura ambiente (18-25 °C). Successivamente le strisce vengono lavate con una *Soluzione di lavaggio* e in ciascuna vaschetta viene aggiunta la *Soluzione Coniugato*. Dopo un'incubazione di 30 minuti si lava di nuovo e si aggiunge la *Soluzione*

substrato e, dopo incubazione di quest'ultima e sua successiva rimozione, la *Soluzione di Stop* che verrà anch'essa incubata e successivamente aspirata. Come ultimo passaggio si rimuoveranno le strisce dalle vaschette e, una volta asciugate, si passerà all'interpretazione dei risultati.

L'identità e la localizzazione degli antigeni e dei controlli immobilizzati sulla striscia sono i seguenti:

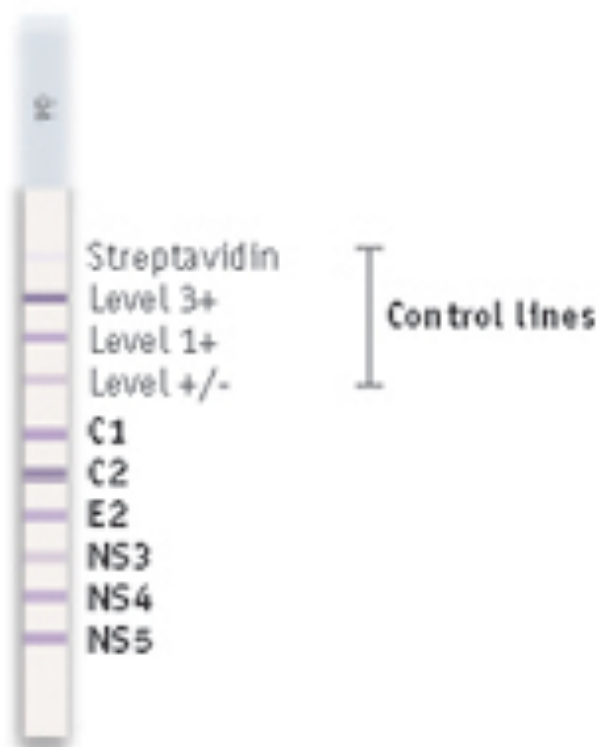


Fig. 3.3 : INNO-LIA HCV Score test strip

L'intensità della reazione sulle bande di controllo di ciascuna striscia viene utilizzata per assegnare il valore di reattività per ogni antigene su ogni striscia.

Intensità della reazione della banda antigenica (R)		Valore
Minore di \pm	$R < \pm$	-
Uguale a \pm	$R = \pm$	\pm
Maggiore di \pm , ma minore o uguale a 1+	$\pm < R \leq 1+$	1+
Maggiore di 1+ ma minore di 3+	$1+ < R < 3+$	2+
Uguale a 3+	$R = 3+$	3+
Maggiore di 3+	$R > 3+$	4+

Un campione è NEGATIVO per anticorpi anti-HCV:

- Se tutte le bande antigeniche HCV hanno un valore di reattività negativo
- Se solo una delle bande antigeniche HCV mostra la reattività \pm , eccetto quando la reattività viene osservata per NS3.

Un campione è POSITIVO per anticorpi anti-HCV:

- Se almeno due bande antigeniche HCV mostrano una reattività minima di \pm o maggiore.

Un campione è considerato INDETERMINATO per anticorpi anti-HCV:

- Se una banda antigenica HCV mostra una reattività di 1+ o maggiore
- Se la banda NS3 reagisce con un valore \pm o maggiore e tutte le altre bande antigeniche sono negative

Se si ottiene un risultato INDETERMINATO si raccomanda di testare un ulteriore campione del paziente dopo qualche settimana. (44)

3.2.2.2 Il pannello per l'HBV

Quando un campione di sangue risulta reattivo al test per l'HBsAg nasce il bisogno di testare tale campione con altri saggi. Nello specifico i vari test che vengono utilizzati per avere una visione completa di quelli che sono i marcatori per l'HBV sono:

- Anti-HBC II
- Anti-HBC IgM
- HBeAg

- Anti-HBe

- Anti-HBs quantitativo

Ciascuno di questi test rientra nella categoria CMIA (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*).

L'**Anti-HBc II** è un saggio qualitativo in grado di valutare la presenza di anticorpi sviluppati contro l'antigene core del virus dell'epatite B (anti-HBc). Il saggio utilizza microparticelle ricoperte con l'antigene core ricombinante (rHBcAg) in modo da poter individuare eventuali anticorpi anti-HBc. Tali anticorpi compaiono nel siero poco dopo la comparsa dell'antigene di superficie (HBsAg) durante le infezioni acute da HBV. Persistono in circolo anche dopo la scomparsa dell'HBsAg e prima della possibile determinazione in circolo degli anticorpi contro di esso (anti-HBs). Se un individuo presenta livelli rilevabili di anti-HBc e se non si hanno ulteriori informazioni relative agli altri *markers* HBV, dobbiamo considerare quell'individuo come attivamente infetto da HBV oppure come un individuo la cui infezione da HBV è stata completamente risolta, lasciando la persona immune. La presenza di anti-HBc non differenzia l'infezione tra infezione acuta o cronica. Il saggio consiste di due passaggi; nel primo il campione può combinarsi con le microparticelle ricoperte con l'antigene ricombinante HBc e, nel secondo passaggio, l'aggiunta di anticorpi coniugati con acridinio specifici per gli anti-HBc permette la misurazione, tramite unità di luce relativa (RLU), dell'ammontare di anti-HBc presente nel campione.

La presenza o l'assenza di anti-HBc nel campione è determinata comparando il segnale chemiluminescente della reazione al segnale chemiluminescente del *cutoff*. Se il segnale

chemiluminescente del campione è maggiore o uguale al segnale di *cutoff*, il campione viene considerato reattivo per l'anti-HBc. (47)

Il saggio qualitativo **Anti-HBc IgM** utilizza un antigene core ricombinante per l'HBV coniugato con acridinio per la determinazione di IgM anti-HBc, in modo da identificare un'eventuale infezione virale recente. Le IgM specifiche contro tale antigene vengono solitamente evidenziate nella maggior parte delle infezioni virali acute e sono quindi considerate un *marker* attendibile per l'infezione acuta da HBV. La concentrazione di IgM anti-HBc cresce rapidamente in pazienti nella fase acuta dell'infezione, fino a raggiungere elevati livelli. Anche l'antigene di superficie (HBsAg) è solitamente presente nella fase acuta dell'infezione e quindi, anch'esso, viene considerato un *marker* sierologico attendibile ma ci sono in letteratura casi in cui l'HBs Ag non è stato rilevato. Nella fase di convalescenza, le IgM anti-HBc persistono anche dopo la scomparsa dell'HBsAg e decresceranno poi piuttosto lentamente. Nel caso in cui non si abbiano informazioni su altri marcatori per l'HBV, un individuo con livelli rilevabili di IgM anti-HBc deve essere considerato come attivamente infetto o con un'infezione pregressa da HBV.

Il saggio ARCHITECT Anti-HBc IgM consiste di due passaggi: nel primo il campione e le microparticelle ricoperte da IgM contro anticorpi umani (anti-human IgM di topo) vengono combinati. Le IgM presenti nel campione si legheranno alle IgM anti-human presenti sulle microparticelle. Nel secondo passaggio viene aggiunto il coniugato acridinio-rHBcAg al quale si legheranno le IgM specifiche anti-HBc. La risultante reazione chemiluminescente viene misurata come unità di luce relativa (RLUs). Esiste una relazione diretta tra l'ammontare delle IgM anti-HBc presenti nel campione e le RLUs rilevate al sistema ottico ARCHITECT. La

presenza o l'assenza di anti-HBcIgM nel campione è determinata comparando il segnale chemiluminescente della reazione al segnale chemiluminescente del *cutoff*. Se il segnale chemiluminescente della reazione è maggiore o uguale al segnale di *cutoff*, il campione viene considerato reattivo per l'anti-HBcIgM. (48)

Il saggio **ARCHITECT HBeAg** viene utilizzato per la rilevazione qualitativa dell'antigene "e" dell'HBV (HBeAg) nel siero o nel plasma umano. La determinazione dell'HBeAg può essere utilizzata per monitorare la progressione dell'infezione da HBV. L'HBeAg è rilevabile sin dalla fase iniziale dell'infezione virale dopo la comparsa dell'HBsAg. I titoli di entrambi gli antigeni crescono rapidamente durante il periodo di replicazione virale dell'infezione acuta. La presenza dell'HBeAg correla con un numero crescente di virus infettivi, con la presenza nel nucleo degli epatociti di particelle del core e con la presenza di DNA e di DNA polimerasi del virus dell'epatite B nel siero. L'HBeAg può persistere assieme all'HBsAg nelle infezioni virali croniche da HBV.

Si tratta di un saggio a due passaggi; nel primo *step* il campione viene combinato con microparticelle ricoperte da anti-HBe. L'HBeAg presente nel campione può così legarsi agli anti-HBe che ricoprono le microparticelle. Nello *step* successivo viene aggiunto il coniugato anti-HBe-acridinio. La risultante reazione chemiluminescente viene misurata come unità di luce relativa (RLUs). Esiste una relazione diretta tra l'ammontare di HBeAg presente nel campione e le RLUs rilevate al sistema ottico ARCHITECT. La presenza o l'assenza di HBeAg nel campione è determinata comparando il segnale chemiluminescente della reazione al segnale chemiluminescente del *cutoff*. Se il segnale chemiluminescente della reazione è minore del segnale di *cutoff*, il campione viene considerato non reattivo per l'HBeAg. (49)

L'**Anti-HBe** è il saggio che viene utilizzato per la rilevazione qualitativa di anticorpi specifici per l'HBe antigene del virus dell'epatite B. Sia l'antigene "e" (HBeAg) che i suoi anticorpi (anti-HBe), sono rilevati durante un'infezione virale da HBV. L'HBeAg è rilevabile nella fase iniziale dell'infezione virale, dopo la comparsa dell'antigene di superficie (HBsAg) e i titoli di entrambi gli antigeni crescono rapidamente durante la fase di replicazione virale dell'infezione acuta. La sierconversione da HBeAg ad anti-HBe è solitamente indicativa di risoluzione dell'infezione acuta. Inoltre la sierconversione HBe antigene/anticorpo è utilizzata come indicatore della risposta virologica durante il trattamento di pazienti affetti da epatite B cronica.

Ancora una volta siamo di fronte ad un saggio a due passaggi: nel primo il campione, il reagente neutralizzante e le microparticelle ricoperte da anti-HBe vengono fatti reagire in modo che gli anti-HBe presenti nel campione si leghino all'HBeAg ricombinante presente nel reagente neutralizzante. L'HBeAg ricombinante non legato è disponibile per legarsi alle microparticelle ricoperte dagli anti-HBe. Nel secondo passaggio viene aggiunto il coniugato acridinio-anti-HBe e la risultante reazione chemiluminescente viene misurata come unità di luce relativa (RLUs). Esiste una relazione inversa tra l'ammontare di anti-HBe presente nel campione e le RLUs rilevate dal sistema ottico ARCHITECT. La presenza o l'assenza di anti-HBe nel campione è determinata comparando il segnale chemiluminescente della reazione al segnale chemiluminescente del *cutoff*. Se il segnale chemiluminescente della reazione è maggiore del segnale di *cutoff*, allora il campione viene considerato non reattivo per anti-HBe. (50)

Il saggio **Anti-HBs** è utilizzato per la determinazione quantitativa degli anticorpi specifici per l'antigene di superficie (HBsAg), di cui ne determina la concentrazione nel siero o plasma umano. Tale saggio è spesso utilizzato per monitorare il successo della vaccinazione per l'epatite B. E' stato infatti dimostrato che la presenza di anti-HBs è un importante fattore di protezione contro le infezioni da HBV; numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia del vaccino per l'epatite B nello stimolare il sistema immunitario a produrre anticorpi contro l'antigene di superficie e, quindi, nella prevenzione dell'infezione da HBV. Il saggio Anti-HBs è anche utilizzato per monitorare la fase di convalescenza di individui affetti da epatite B. La presenza di anti-HBs, dopo un'infezione acuta, e la scomparsa dell'antigene di superficie può essere un utile indicatore di risoluzione della malattia. La rilevazione di anti-HBs in un individuo asintomatico può indicare una precedente esposizione al virus.

I campioni che presentano una concentrazione di anti-HBs inferiore a 10,0 mUI/ml sono considerati non reattivi dal saggio ARCHITECT Anti-HBs. I campioni che presentano concentrazioni di anti-HBs superiori o uguali a 10,0 mUI/ml sono considerati reattivi.

Si tratta di un saggio a due passaggi: nel primo il campione e gli HBsAg ricombinanti (rHBsAg) adesi ad appropriate microparticelle, vengono uniti in una miscela di reazione. Gli anticorpi contro l'HBsAg presenti nel campione si legheranno agli antigeni ricombinanti (rHBsAg) presenti sulle microparticelle. Dopo un lavaggio, viene aggiunto il coniugato acridinio-rHBsAg e la risultante reazione chemiluminescente viene misurata come unità di luce relativa (RLUs). Esiste una relazione diretta tra l'ammontare degli anti-HBs nel campione e le RLU rilevate dal sistema ottico ARCHITECT. La concentrazione degli anti-HBs nel campione è determinata usando una curva di calibrazione per anti-HBs generata dal sistema ARCHITECT. Se la

concentrazione rilevata nel campione è maggiore o uguale a 10,0 mUI/ml, il campione viene considerato reattivo per gli anti-HBs.

3.2.3 La cromatografia per esclusione molecolare

Alla base di tutte le forme di cromatografia troviamo il coefficiente di distribuzione (K_d), il quale descrive il modo in cui un composto si distribuisce tra due fasi immiscibili. Per due fasi immiscibili, A e B, e a una data temperatura, il valore per questo coefficiente è una costante ed è dato dalla seguente espressione:

$$\text{concentrazione nella fase A} / \text{concentrazione nella fase B} = K_d$$

In genere, tutti i sistemi cromatografici consistono di una fase stazionaria, che può essere un solido, un gel, un liquido o una miscela solido/liquido, la quale viene immobilizzata, e la fase mobile, che può essere liquida o gassosa e che fluisce sopra o attraverso la fase stazionaria. Nella cromatografia su colonna, la fase stazionaria, attaccata ad un'opportuna matrice (un supporto inerte ed insolubile), viene "confezionata"/"impacchettata" in una colonna di vetro o di metallo dove verrà fatta poi fluire la fase mobile. Il passaggio della fase mobile attraverso la colonna è garantito o dalla forza di gravità o dall'uso di un sistema di pompaggio. Il campione da analizzare viene disciolto in un solvente opportuno e applicato alla fase stazionaria. La fase mobile normalmente consiste in un solvente organico al quale è consentito di fluire continuamente attraverso la fase stazionaria, determinando in questo modo la progressiva separazione dei vari componenti (analiti) presenti nel campione. Gli analiti che presentano la maggiore solubilità nella fase mobile si muoveranno lungo la fase stazionaria più velocemente. Quando un particolare analita è stato rimosso dalla colonna

grazie al passaggio della fase mobile, si dice che è stato eluito. Un tipico sistema di cromatografia su colonna che usa una fase mobile liquida consiste di una colonna, della fase mobile, di un rilevatore per identificare i composti separati (analiti) nell'ordine e modo esatto in cui essi emergono dalla colonna e un registratore. Il rilevatore ed il registratore permettono una continua rilevazione della presenza dell'analita nell'effluente grazie alla sua misurazione che avviene per mezzo di parametri fisici come l'assorbimento nell'ultravioletto. Ogni analita che viene separato è rappresentato come un picco sul registratore grafico.

La cromatografia su colonna può essere suddivisa in varie tipologie in base alla pressione che viene generata nella colonna durante il processo di separazione. La cromatografia liquida a bassa pressione (Low Pressure Liquid Chromatography- LPLC) genera pressioni inferiori a 5 bar (1 bar=0.1 MPa); la cromatografia liquida a media pressione (MPLC) genera pressioni comprese tra 6 e 50 bar e la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) genera pressioni superiori a 50 bar. (46)

3.2.3.1 Reagenti

La γ -Glutammina-7-amido-4-metilcumarina (γ GluAMC, G7261), la Glicil-glicina (GlyGly, G1002) e tutti i reagenti chimici sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Italia).

3.2.3.2 Determinazione delle frazioni plasmatiche di GGT

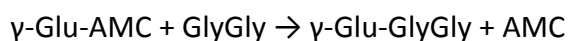
La determinazione dell'attività totale della GGT e delle sue frazioni è stata eseguita su campioni di plasma-EDTA (*Ethylenediamine-tetra-acetic acid*) mediante l'impiego di un sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*, AKTA purifier, GE Healthcare) dotato di una colonna con un gel di filtrazione cromatografico (Superose 6 HR 10/300 GL, GE

Healthcare Europe) ed un rilevatore fluorescente (Jasco FP-2020, Jasco Europe, Lecco, Italy). La colonna per cromatografia ad esclusione molecolare è stata calibrata per separare le componenti plasmatiche in base al loro peso molecolare ed alla loro forma (25). Per questo tipo di separazione, vengono utilizzate le proprietà di setaccio molecolare che sono proprie di numerosi materiali porosi, ovvero composti organici polimerici che, mediante legami crociati, formano una rete tridimensionale di pori che conferisce loro le proprietà di un gel. Questa colonna di particelle di gel si trova in equilibrio con una fase mobile adatta per la separazione voluta, che fluisce sulla fase stazionaria adesa ad una matrice fissa ed impaccata all'interno della colonna di vetro. Le molecole più grosse saranno completamente escluse dai pori e quindi passeranno attraverso gli spazi interstiziali e compariranno per prime nell'eluato; le molecole più piccole, invece, si distribuiranno tra la fase mobile all'interno e all'esterno del setaccio molecolare e perciò transiteranno in colonna con una velocità inferiore, eluendo quindi per ultime. La quota di fase mobile assorbita dal gel che risulta accessibile all'analita dipende dalla porosità del gel e dalla dimensione della molecola stessa; quindi la distribuzione di un analita in una colonna dipende esclusivamente dal volume complessivo di fase mobile, sia interno che esterno alle particelle di gel al quale esso può accedere. Per ogni tipo di gel, il coefficiente di distribuzione K_d per un certo analita tra fase mobile interna ed esterna dipende dalle sue dimensioni: se la molecola di analita è grande e perciò completamente esclusa dalla fase mobile presente all'interno del gel, si avrà $K_d = 0$, mentre se l'analita è sufficientemente piccolo da avere completo accesso alla fase mobile interna, sarà $K_d = 1$.

Le quattro frazioni di GGT sono state separate mediante una eluizione isocratica, al flusso di 0.5 mL/min, con un tampone di sodio fosfato 0.1 mol/L (pH 7.4) contenente NaCl 0.2 mol/L, 0.1 mmol/L di EDTA e 4.5 mmol/L di GlyGly come accettore della reazione di transpeptidazione catalizzata dalla GGT. I campioni di plasma sono filtrati mediante un filtro 0.45- μ m PVDF (Millipore) prima dell'iniezione.

Per poter determinare in continuo l'attività di GGT a valle della colonna, attraverso una connessione a T, all'eluato del gel di filtrazione è stata continuamente aggiunta una soluzione contenente il substrato fluorescente per la GGT, gamma-glutamyl-7-amido-4-methylcoumarin (γ GluAMC), rilasciata al flusso di 0.1 mL/min. La miscelazione dell'eluato della colonna con il substrato della GGT (γ GluAMC 0.030 mmol/L) avviene in una spira con un volume di 2.6 ml (PFA, 2.6 mL) corrispondente ad un'incubazione di circa 4.5 minuti, posta in un bagnetto termostatico a 37 °C.

Poiché l'accettore della reazione catalizzata dalla GGT è incluso nella fase mobile, la presenza dell'enzima è visualizzata attraverso la liberazione del composto fluorescente amminometilcumarina (AMC) secondo la reazione:



Il prodotto AMC è rilevato tramite un fluorimetro operante ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 380 nm e di emissione di 440 nm. La soluzione madre di γ GluAMC è stata preparata alla concentrazione di 4.5 mmol/L in etanolo 30% w/w contenente NaOH 0.005N e conservata ad una temperatura di -20 °C. Questa soluzione è stata diluita giornalmente 25 volte in tampone Tris-HCL 0.25 M, pH 8.5 (25 C°).

L'intensità di fluorescenza del segnale è espresso in unità arbitrarie di fluorescenza (f.u.) e l'area sotto i picchi è proporzionale all'attività di GGT. (25) (Fig. 3.4)

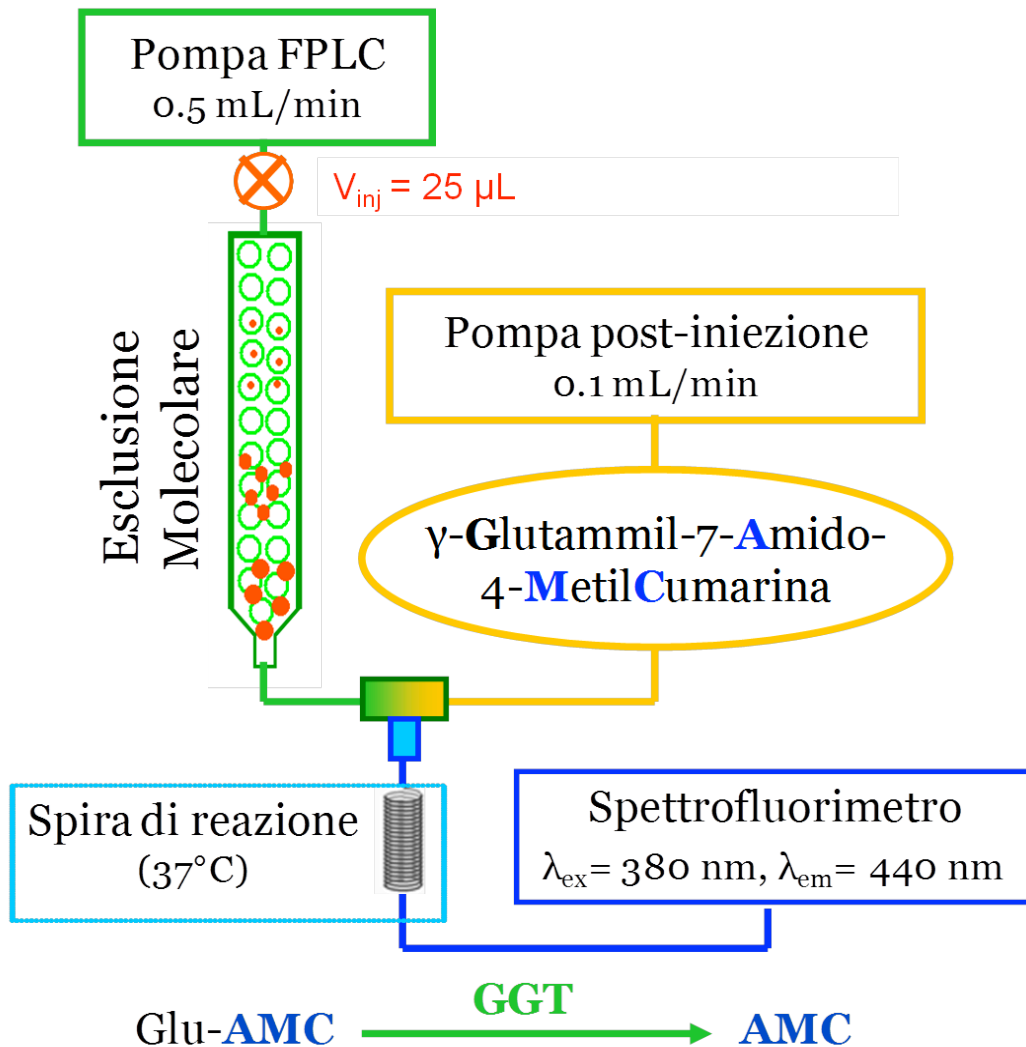


Figura 3.4: Schema delle componenti dello strumento per la separazione e la determinazione dell'attività totale di GGT e delle sue frazioni.

3.2.3.3 Quantificazione delle frazioni di GGT.

L'area delle frazioni di GGT è stata calcolata con l'aiuto del software MATLAB (Version 7 MathWorks, Inc.). Il programma permette di descrivere ogni picco con una curva Gaussiana modificata esponenzialmente; per ogni curva sono stati definiti gli intervalli di variazione dell'altezza, della larghezza a metà altezza, della posizione e della asimmetria. L'area è stata calcolata utilizzando un algoritmo non lineare di minimizzazione dei minimi quadrati, la somma delle quattro curve così ottenute corrisponde al cromatogramma registrato.

L'attività totale di GGT, espressa in U/L, è stata calcolata con una curva di calibrazione costruita utilizzando il plasma con attività nota di GGT (standard). La retta è stata costruita mettendo sull'ascisse i dati relativi all'attività di GGT dei campioni standard e sull'ordinate i dati relativi all'area sottesa al cromatogramma ottenuto dall'analisi di tali campioni mediante gel di filtrazione. Il valore della pendenza della retta è utilizzato per poter esplicitare l'attività delle frazioni di GGT in U/L.

3.3 Statistica:

Le variabili distribuite normalmente sono state confrontate con l'analisi della varianza a una via (ANOVA); nel caso in cui tale test sia risultato significativo, è stato applicato il test di Bonferroni per il confronto multiplo in modo da indagare ulteriormente tra quali coppie di gruppi le differenze siano significative. (Controlli vs Reattivi; Controlli vs Positivi; Reattivi vs Positivi); le variabili con distribuzione asimmetrica sono state confrontate con il test di

Kruskal-Wallis (analisi della varianza a una via non parametrica) e, se significativo, si è proceduto con il test di Dunn per il confronto multiplo.

Le eventuali correlazioni tra i valori di viremia nel gruppo dei Positivi e le variabili ALT, AST, GGT Tot, b-GGT, m-GGT, s-GGT, f-GGT, b-GGT/s-GGT, sono state valutate con l'analisi non parametrica di Spearman. Con tale analisi statistica è possibile valutare la tendenza di una variabile a variare in funzione di un'altra. La correlazione può essere positiva, quando le variabili in esame co-variano, oppure può essere negativa quando all'aumentare dell'una l'altra diminuisce. Il grado di correlazione fra due variabili è espresso mediante l'indice di correlazione che assume valori compresi tra -1 (quando le variabili considerate sono inversamente correlate) e +1 (quando vi sia correlazione assoluta cioè quando alla variazione di una variabile corrisponde una variazione rigidamente dipendente dell'altra). Un indice di correlazione pari a zero indica un'assenza di correlazione.

I valori di mediana di AST, GGT totale e delle frazioni nei due sottogruppi ottenuti dal gruppo dei Positivi sono state confrontate con il test di Mann-Whitney.

L'analisi della curva ROC è una tecnica statistica che misura l'accuratezza di un test diagnostico lungo tutto il *range* dei valori possibili. La capacità discriminante di un test, ossia la sua attitudine a separare propriamente la popolazione in studio in "malati" e "sani" è proporzionale all'estensione dell'area sottesa alla curva ROC (*Area Under Curve*, AUC) ed equivale alla probabilità che il risultato di un test su un individuo estratto a caso dal gruppo dei malati sia superiore a quello di uno estratto a caso dal gruppo dei non-malati. Nel caso di un test perfetto, ossia che non restituisce alcun falso positivo né falso negativo (capacità discriminante = 100%), la AUC passa attraverso le coordinate {0;1} ed il suo valore

corrisponde all'area dell'intero quadrato delimitato dai punti di coordinate (0,0), (0,1), (1,0) (1,1), che assume valore 1 corrispondendo ad una probabilità del 100% di una corretta classificazione. Al contrario, la ROC per un test assolutamente privo di valore informativo è rappresentata dalla diagonale che passa per l'origine, con AUC=0.5.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Descrizione della popolazione: le variabili cliniche

In questo lavoro di tesi sono stati presi in considerazione tre gruppi di soggetti, ciascuno costituito da 43 individui (n=43), di cui 26 maschi e 17 femmine, tutti reclutati presso l'azienda ASL 2 di Lucca. Il gruppo dei **Controlli negativi** è costituito da donatori di sangue i quali, al momento della donazione, sono risultati essere NEGATIVI al test per l'HBs Antigene e al test HCV Ab. Il gruppo dei **Reattivi** è costituito da donatori di sangue che, al momento della donazione, hanno avuto esito REATTIVO al test per l'HBs Antigene o al test HCV Ab. Infine, il gruppo dei **Positivi** è costituito da pazienti esterni o dei reparti ospedalieri i quali, al momento del prelievo, sono risultati essere POSITIVI alla ricerca di RNA del virus HCV e/o degli anticorpi contro di esso. Per ogni soggetto arruolato nello studio ho ottenuto un campione di plasma per l'analisi delle frazioni di GGT ed ho avuto accesso agli esami di laboratorio utili ad avere una visione più globale della condizione del soggetto. In **Tabella 4.1** sono riportate le caratteristiche prese in considerazione e per le quali sono state calcolate la media e la deviazione standard ($M \pm DS$) o, in alternativa, la mediana e il 25° e 75° percentile [Me (25°-75°)]. In **Tabella 4.2** sono riportati i valori di significatività statistica per il confronto di tali variabili nei tre gruppi. Non è stato possibile, però, recuperare tutti i valori delle variabili considerate per ciascun soggetto.

L'**età** media dei Controlli è di 40,6 anni; il gruppo dei Reattivi ha un'età media leggermente superiore (43,93 anni) ma confrontabile con quella dei controlli ($P > 0.05$), mentre il gruppo

dei Positivi presenta un'età media (49,58 anni) significativamente più elevata rispetto al gruppo dei Controlli ($P < 0.05$), ma non dei reattivi.

Come possiamo vedere dalla **Tabella 4.2**, non tutte le variabili prese in considerazione sono risultate statisticamente significative. Tra quelle analizzate, oltre l'età, solo la concentrazione plasmatica di albumina, della alanina-aminotransferasi (ALT) e il numero dei globuli bianchi risultano essere significativamente diverse nel gruppo dei Positivi, costituito da pazienti con epatite virale HCV, rispetto ai gruppi Controllo e Reattivi.

La concentrazione plasmatica di **albumina** è un parametro indice della capacità sintetica del fegato e risulta spesso ridotto in pazienti con epatite; i valori medi dei gruppi Controllo e Reattivi rientrano all'interno dei valori di riferimento (3,5-5,0 g/dL); il gruppo dei Positivi, invece, mostra un valore medio più basso rispetto a quelli riscontrati negli altri due gruppi, pur rimanendo anch'esso all'interno dei valori di riferimento. Ciò dimostra una riduzione della capacità sintetica epatica nel gruppo dei Positivi.

Anche la variabile **ALT**, indice di danno epatocellulare, risulta essere in linea con ciò che ci si aspetterebbe, ovvero un valore più elevato nel gruppo dei Positivi. L'ALT viene espressa in Unità internazionali/litro (U/L) e l'intervallo di valori preso come riferimento è 5-45 U/L per gli uomini e 5-35 U/L per le donne. I soggetti Controllo e i Reattivi hanno un valore medio di ALT nella norma, mentre il gruppo dei Positivi presenta un valore medio significativamente più elevato rispetto agli altri due gruppi.

Infine, prendendo in considerazione la variabile **globuli bianchi**, possiamo vedere nuovamente che la soglia di significatività viene raggiunta nel confronto "Controlli vs.

Positivi” e “Reattivi vs. Positivi” mentre il confronto “Controlli vs. Reattivi” risulta non significativo. In ogni caso il valore medio nei tre gruppi rientra nell’intervallo di normalità ($4-10 \cdot 10^9/L$).

Tutte le altre variabili considerate (*cfr.* **Tabella 4.1**) non sono risultate statisticamente diverse nei tre gruppi oggetto dello studio.

I valori di **glicemia** (valori di riferimento: 65-110 mg/dL) dei tre gruppi rientrano tutti nell’intervallo di normalità. La **creatinina** si mantiene, nei tre gruppi, all’interno dell’intervallo di normalità: 0,5-1,2 mg/dL per gli uomini, 0.5-1 mg/dL per le donne. Anche i valori di concentrazione delle **proteine totali** (valori di riferimento: 6,6-8,7 g/dL) sono nella norma in ciascuno dei tre gruppi. I valori plasmatici di **colesterolo totale** (valori di riferimento: 120-190 mg/dL) e i **trigliceridi** (valori di riferimento: 20-180 mg/dL), espressi entrambi in mg/dL, rientrano nell’intervallo di normalità per ciascuno dei tre gruppi. La **ferritina** (valori di riferimento: 30-400 ng/mL negli uomini; 13-150 ng/mL nelle donne premenopausa) è stata valutata nel gruppo Controllo e in quello dei Reattivi, visto che costituisce un parametro richiesto nei donatori di sangue per valutare la riserva di ferro e decidere, quindi, se il soggetto è in condizioni idonee per la donazione, ma non nel gruppo dei pazienti Positivi al virus HCV; in entrambi i gruppi di donatori i valori di ferritina sono risultati normali.

Infine, per quanto riguarda i parametri ematologici è stato preso in considerazione anche il numero delle **piastrine**, le quali presentano un intervallo di normalità compreso tra 130 e 450 per $10^9/L$; tale parametro risulta normale in tutti e tre i gruppi.

Tabella 4.1: Caratteristiche dei soggetti selezionati per lo studio

	Controlli	Reattivi	Positivi
Numero Tot	43	43	43
Maschi	26	26	26
Femmine	17	17	17
Età (anni)	40,60 ± 10,61 (n=43)	43,93 ± 11,66 (n=43)	49,58 ± 13,56 (n=43)
Glucosio (mg/dL)	90,40 ± 10,35 (n=43)	87,42 ± 11,84 (n=43)	96,55 ± 25,24 (n=20)
Creatinina (mg/dL)	0,83 ± 0,16 (n=43)	0,88 ± 0,14 (n=43)	0,85 ± 0,24 (n=18)
Proteine Totali (g/dL)	7,35 ± 0,29 (n=43)	7,42 ± 0,43 (n=43)	7,38 ± 0,39 (n=13)
Albumina (g/dL)	4,44 ± 0,26 (n=24)	4,56 ± 0,32 (n=29)	4,09 ± 0,35 (n=13)
Colesterolo Tot (mg/dL)	196,98 ± 32,52 (n=43)	205,14 ± 39,52 (n=43)	194,17 ± 41,31 (n=12)
Trigliceridi (mg/dL)	77 (53 - 105) (n=43)	93 (72 - 120,5) (n=43)	80,5 (57,25 - 132,75) (n=12)
ALT (U/L)	17 (15 - 23) (n=43)	21 (15 -27) (n=43)	40,5 (17,25 - 92,5) (n=42)
Globuli Bianchi (10⁹/L)	7,17 ± 1,64 (n=43)	7,07 ± 1,29 (n=43)	6,04 ± 2,55 (n=36)
Ferritina (ng/mL)	72,67 ± 56,28 (n=43)	87,02 ± 75,49 (n=43)	
Piastrine (10⁹/L)	205,86 ± 40,04 (n=43)	201,67 ± 50,60 (n=43)	200,31 ± 66,19 (n=36)

I dati sono espressi come media ± deviazione standard, oppure come mediana (25°-75° percentile).

Tabella 4.2. Confronto statistico delle variabili raccolte nei tre gruppi oggetto dello studio: controlli (C), reattivi ai test di screening per HCV o HBV (R); pazienti con epatite virale HCV (P).

Variabili	Valori di P			
	Analisi della Varianza	C vs. R	C vs. P	R vs. P
Età	0.0028	n.s.	<0.05	n.s.
Glucosio	n.s. (0.0786)	/	/	/
Creatinina	n.s. (0.3445)	/	/	/
Prot. Tot	n.s. (0.6746)	/	/	/
Albumina	<0.0001	n.s.	<0.05	<0.05
Colest. Tot	n.s. (0.4928)	/	/	/
Trigliceridi*	n.s. (0.2123)	/	/	/
ALT*	<0.0001	n.s.	<0.05	<0.05
Globuli Bianchi	0.0164	n.s.	<0.05	<0.05
Ferritina	n.s. (0.3205)	/	/	/
Piastrine	n.s. (0.8840)	/	/	/

Le variabili distribuite normalmente sono state confrontate con l'analisi della varianza a una via associata al test di Bonferroni per il confronto multiplo. Le variabili con distribuzione asimmetrica (*) sono state confrontate con il test di Kruskal-Wallis associato al test di Dunn per il confronto multiplo. N.s.: non significativo. Soglia statistica di significatività $P \leq 0,05$.

4.2 Descrizione della popolazione: le frazioni di GGT

Oltre alle variabili cliniche sono stati presi in considerazione i risultati ottenuti dall'analisi cromatografica delle frazioni di GGT. Nella **Tabella 4.3** sono riportati i valori dell'attività, espressa in Unità/litro (U/L), della GGT Totale, delle sue frazioni (b-GGT, m-GGT, s-GGT e f-GGT), del rapporto b-GGT/s-GGT e, infine, la differenza tra il volume di eluizione di f-GGT e il volume di eluizione di s-GGT. Le suddette variabili sono state confrontate, applicando appropriati test statistici, in modo da valutare se esistano differenze significative tra i tre gruppi. Nella **Tabella 4.4** sono riportati i valori di significatività.

Il confronto tra i valori di GGT Totale, all'applicazione del test di Kruskal-Wallis, è risultata statisticamente significativa; ho proceduto quindi all'applicazione del test di Dunn per il confronto multiplo, il quale è risultato significativo per le coppie di gruppi "Controlli vs. Positivi" e "Reattivi vs. Positivi". Il confronto "Controlli vs. Reattivi" non è risultato significativo. Si può osservare inoltre che nel gruppo dei Positivi, il 75% dei pazienti presenta un valore di GGT più alto del valore di mediana dei soggetti Controllo e dei Reattivi (**Tabella 4.1 e Figura 4.1**), analogamente a quanto osservato per la variabile ALT; in ogni caso tali valori rientrano tutti nell'intervallo di normalità (<60 U/L per gli uomini, <31U/L per le donne) tranne che per 5 donne (intervallo: 39-62 U/L) e quattro uomini (intervallo: 68-173 U/L). Questi nove pazienti presentano anche valori di ALT che superano il livello superiore di riferimento (intervallo: 40-288 U/L per le donne; 78-211 U/L per gli uomini). Nel gruppo dei Reattivi ho riscontrato la presenza di una donna e due uomini con una lieve-moderata alterazione della GGT (116; 62; 68; U/L) e di ALT (46; 55; 63 U/L, rispettivamente), mentre nessun soggetto Controllo presentava un'alterazione di questi due parametri.

La GGT totale è comunemente utilizzata come marcatore di funzionalità epatica, così come la ALT; perciò il riscontro di valori più elevati nel gruppo dei Positivi rispetto ai Controlli è coerente con la presenza di un'epatopatia virale cronica. I dati a disposizione mi permettono di escludere una causa virale di epatopatia nei tre soggetti Reattivi con alterazione della GGT totale e dalla ALT, ma non ho dati sufficienti per ipotizzare la possibile causa dell'alterazione di tali marcatori.

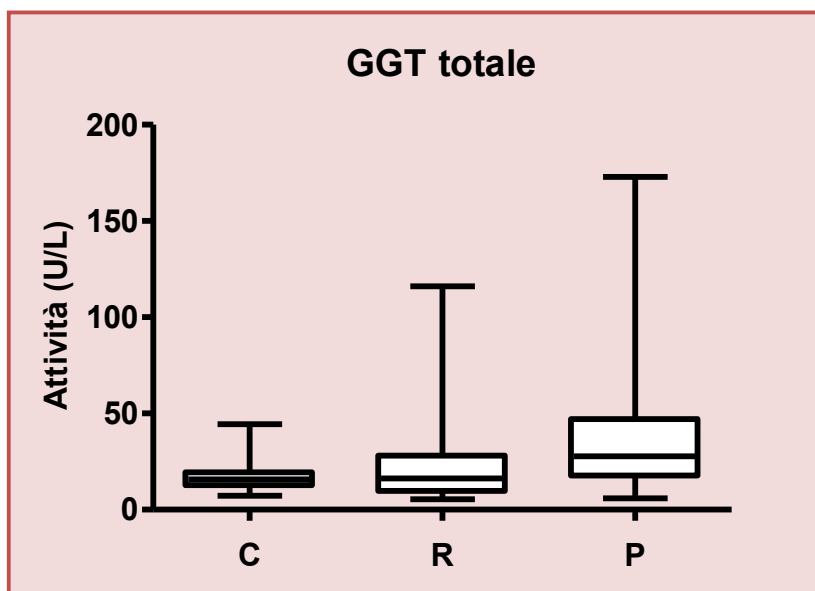


Figura 4.1. Distribuzione dei valori di attività di GGT Totale nei tre gruppi: Controlli (C), Reattivi (R) e positivi (P). Il rettangolo è delimitato dal 25° e dal 75° percentile, il segmento al suo interno rappresenta il valore di mediana e i segmenti esterni sono delimitati dal valore minimo e massimo osservati.

Tabella 4.3. Analisi delle frazioni di GGT nei soggetti selezionati per lo studio

	Controlli (n=43)	Reattivi (n=43)	Positivi (n=43)
GGT Tot (U/L)	15,8 (12,1 – 19,27)	16,2 (9,1 - 27,2)	27,8 (17,1 – 47,0)
b-GGT (U/L)	1,9 (1,2 – 3,3)	1,8 (1,2 – 3,5)	2,6 (1,6 – 3,4)
m-GGT (U/L)	0,4 (0,3 – 0,6)	0,2 (0,1 – 0,7)	0,9 (0,4 – 1,4)
s-GGT (U/L)	4,7 (2,4 – 6,9)	3,5 (2,2 – 9,1)	14,9 (6,1 – 27,5)
f-GGT (U/L)	9,1 (7,2 – 10,5)	8,1 (5,2 – 9,7)	9,2 (7,4-11,5)
b-GGT/s-GGT	0,42 (0,35 – 0,65)	0,43 (0,33 – 0,61)	0,17 (0,12 - 0,26)
Vol. eluizione (f – s-GGT) (mL)	2,61 ± 0,34	2,59 ± 0,30	2,66 ± 0,30

I dati sono espressi come mediana (25°-75° percentile), oppure come media ± deviazione standard.

Tabella 4.4 Confronto statistico tra i valori di GGT totale e delle frazioni nei tre gruppi oggetto dello studio.

Variabili	Valori di P			
	Analisi della Varianza	C vs. R	C vs. P	R vs. P
GGT Totale*	<0.001	n.s.	<0.05	<0.05
b-GGT*	n.s. (0.4913)	n.s.	n.s.	n.s.
m-GGT*	<0.0001	n.s.	<0.05	<0.05
s-GGT*	<0.0001	n.s.	<0.05	<0.05
f-GGT*	n.s. (0.0642)	/	/	/
b-GGT/s-GGT*	<0.0001	n.s.	<0.05	<0.05
Vol. Eluizione (f – s-GGT)	n.s. (0.5977)	/	/	/

Le variabili distribuite normalmente sono state confrontate con l'analisi della varianza a una via associata al test di Bonferroni per il confronto multiplo. Le variabili con distribuzione asimmetrica (*) sono state confrontate con il test di Kruskal-Wallis associato al test di Dunn per il confronto multiplo. n.s.: non significativo. Soglia statistica di significatività $P \leq 0.05$.

I valori di mediana della frazione b-GGT non sono significativamente diversi tra i tre gruppi (Tabelle 4.3 e 4.4) e, infatti, la distribuzione dei valori nei tre gruppi è simile (Figura 4.2). I valori di riferimento per la frazione b-GGT sono 0,7-10,7 U/L per gli uomini e 0,4-5,2 per le donne (Tabella 1.3, Capitolo 1). Nel gruppo Positivi all'infezione HCV un solo soggetto (uomo) presenta un valore di b-GGT oltre il limite superiore di riferimento; nel gruppo dei Reattivi un uomo e una donna presentano un'attività di b-GGT oltre soglia. Tutti i soggetti appartenenti al gruppo dei Controlli presentano valori normali di b-GGT.

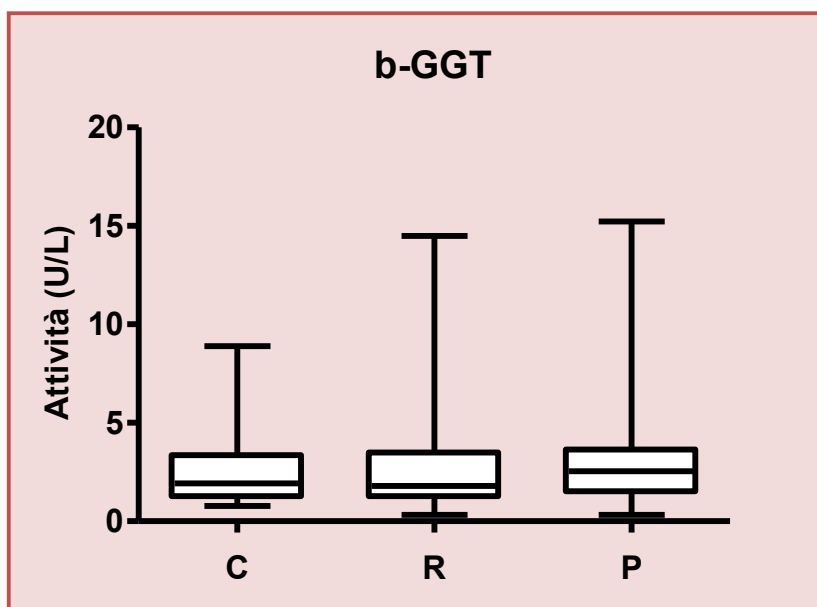


Figura 4.2. Distribuzione dei valori di attività della frazione b-GGT nei tre gruppi: Controlli (C), Reattivi (R) e positivi (P). Il rettangolo è delimitato dal 25° e dal 75° percentile, il segmento al suo interno rappresenta il valore di mediana e i segmenti esterni sono delimitati dal valore minimo e massimo osservati.

Il gruppo dei Positivi presenta valori di mediana delle frazioni m-GGT ed s-GGT statisticamente più elevate rispetto al gruppo Controllo e Reattivi (Tabelle 4.3 e 4.4), mentre non c'è differenza tra questi ultimi due. I valori di riferimento per la frazione m-GGT sono 0,2-3,3 U/L per gli uomini e 0,2-1,2 per le donne (Tabella 1.3, Capitolo 1). Nel gruppo dei Positivi all'infezione HCV due donne e quattro uomini presentano valori di m-GGT oltre il limite superiore di riferimento; nel gruppo dei Reattivi una donna e un uomo presentano un'attività di m-GGT oltre soglia; nei soggetti appartenenti al gruppo dei Controlli solo una donna presenta una lieve alterazione della frazione m-GGT. In Figura 4.3 è riportata la distribuzione dei valori di attività di m-GGT nei tre gruppi e si può osservare come il gruppo dei Positivi presenti valori più elevati e dispersi rispetto al gruppo dei Controlli e dei Reattivi.

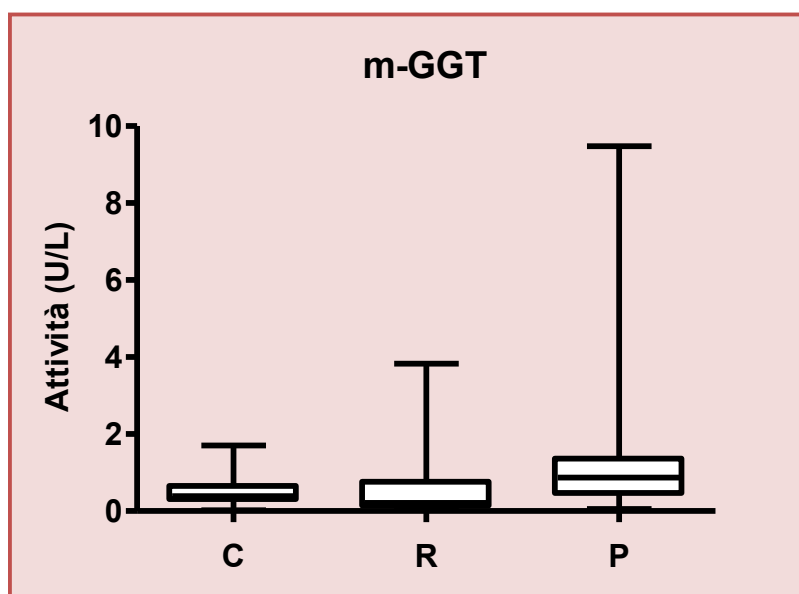


Figura 4.3. Distribuzione dei valori di attività della frazione m-GGT nei tre gruppi: Controlli (C), Reattivi (R) e positivi (P). Il rettangolo è delimitato dal 25° e dal 75° percentile, il segmento al suo interno rappresenta il valore di mediana e i segmenti esterni sono delimitati dal valore minimo e massimo osservati.

I valori di riferimento per la frazione s-GGT sono 2,8-33,7 U/L per gli uomini e 1,5-11,6 per le donne (Tabella 1.3, Capitolo 1). Nel gruppo dei Positivi all'infezione HCV otto donne (intervallo 14-43 U/L) e sei uomini (intervallo 34-126 U/L) presentano valori di s-GGT oltre il limite superiore di riferimento; nel gruppo dei Reattivi una donna e due uomini (s-GGT: 55,6; 36,1; 36,6 U/L rispettivamente) presentano un'attività di s-GGT oltre soglia; nessun Controllo presenta un'alterazione della frazione s-GGT. In Figura 4.4 è riportata la distribuzione dei valori di attività di s-GGT.

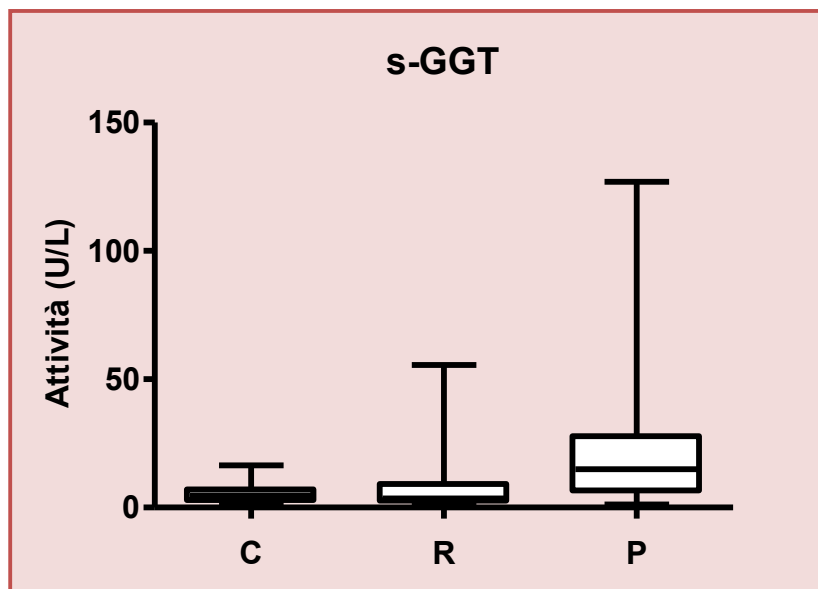


Figura 4.4. Distribuzione dei valori di attività della frazione s-GGT nei tre gruppi: Controlli (C), Reattivi (R) e positivi (P). Il rettangolo è delimitato dal 25° e dal 75° percentile, il segmento al suo interno rappresenta il valore di mediana e i segmenti esterni sono delimitati dal valore minimo e massimo osservati.

Le differenze nei valori di f-GGT tra i tre gruppi non sono risultate significative all'analisi statistica (**Tablelle 4.3 e 4.4**). I valori di riferimento per la frazione f-GGT sono 8,3-19,6 U/L per gli uomini e 4,9-12,5 per le donne (**Tabella 1.3, Capitolo 1**). Nel gruppo dei Positivi all'infezione HCV una donna e un uomo presentano valori di f-GGT oltre il limite superiore di riferimento (13,6 e 20,0 U/L, rispettivamente); nel gruppo dei Reattivi e dei Controlli nessun soggetto presenta un valore alterato di f-GGT. In **Figura 4.5** è riportata la distribuzione dei valori di attività di f-GGT dalla quale è evidente l'ampia sovrapposizione dei livelli di f-GGT nei tre gruppi in studio.

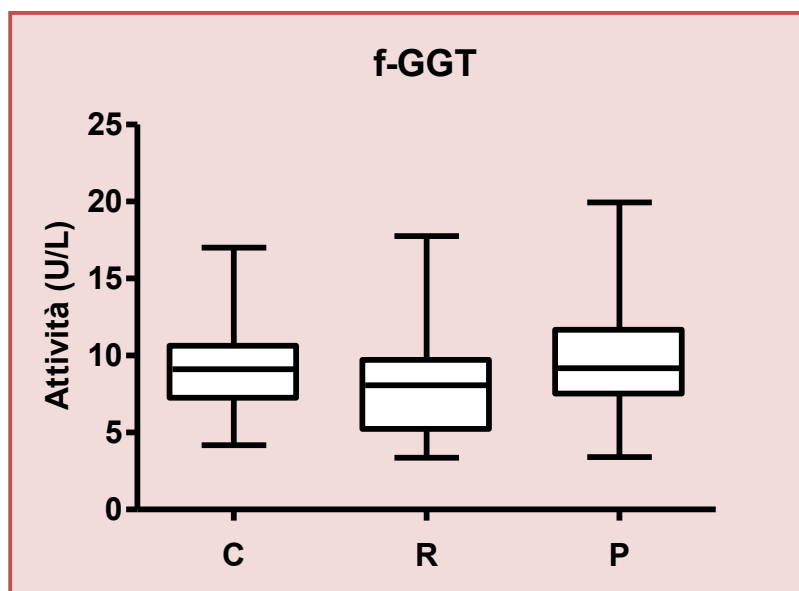


Figura 4.5. Distribuzione dei valori di attività della frazione f-GGT nei tre gruppi: Controlli (C), Reattivi (R) e positivi (P). Il rettangolo è delimitato dal 25° e dal 75° percentile, il segmento al suo interno rappresenta il valore di mediana e i segmenti esterni sono delimitati dal valore minimo e massimo osservati.

Per quanto riguarda il rapporto b-GGT/s-GGT, ho riscontrato valori significativamente più bassi nel gruppo dei Positivi rispetto ai Controlli e ai Reattivi, mentre tra questi ultimi due non ci sono differenze (**Tabella 4.3 e 4.4**). I valori di riferimento per il rapporto b-GGT/s-GGT sono 0,12-0,58 U/L per gli uomini e 0,13-0,67 per le donne (**Tabella 1.3, Capitolo 1**). Nel gruppo dei Positivi all'infezione HCV tre donne (intervallo 0,06-0,10) e sette uomini (intervallo 0,04-0,10) presentano valori del rapporto più bassi del limite inferiore di riferimento e due uomini presentano, invece, un valore del rapporto più alto del limite superiore di riferimento (0,77 e 0,83). Nel gruppo dei Reattivi sette donne (intervallo: 0,68-1,73) e quattro uomini (intervallo 0,59-1,67) presentano un valore del rapporto oltre soglia; tra i Controlli quattro donne (intervallo: 0,72-1,12) e sette uomini (intervallo: 0,69-1,04) presentano un'elevazione del rapporto b-GGT/s-GGT. In nessuno soggetto dei gruppi Controllo e Reattivi ho riscontrato valori del rapporto al di sotto del limite inferiore di riferimento. In **Figura 4.6** è riportata la distribuzione dei valori del rapporto b-GGT/s-GGT nei tre gruppi; è particolarmente evidente il prevalere di valori bassi di tale rapporto nei soggetti Positivi; infatti circa il 75% dei pazienti con epatite HCV ha valori di rapporti più bassi del 25° percentile riscontrato nei Controlli e nei Reattivi (**Tabella 4.3**).

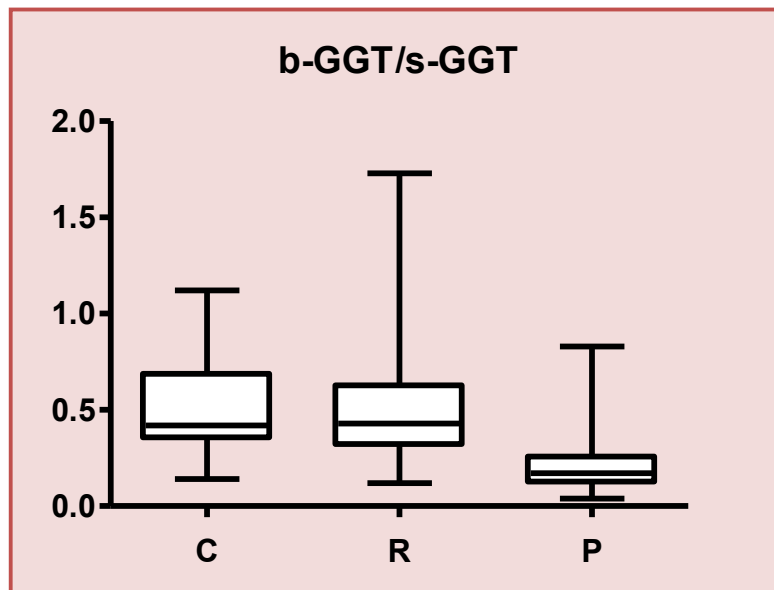


Figura 4.6. Distribuzione dei valori del rapporto b-GG/s-GGT nei tre gruppi: Controlli (C), Reattivi (R) e positivi (P). Il rettangolo è delimitato dal 25° e dal 75° percentile, il segmento al suo interno rappresenta il valore di mediana e i segmenti esterni sono delimitati dal valore minimo e massimo osservati.

Un aspetto che va sicuramente sottolineato è che, come detto pocanzi, sebbene i valori di GGT Totale rientrino nell'intervallo di normalità anche nel gruppo dei Positivi, le varie frazioni di GGT, in particolare la m- e la s-GGT, presentano valori di attività significativamente più elevati rispetto a quelli riscontrati negli altri due gruppi e, visto che il valore del rapporto b-GGT/s-GGT dipende dalle attività di b- ed s-GGT, il fatto di avere nei positivi una s-GGT più elevata, porta ad una concomitante riduzione di tale rapporto che presenta valori, nei Positivi, pari a 0,17 (0,12-0,26), nettamente al di sotto dei valori riscontrati negli altri due gruppi [Controlli: 0,42 (0,35-0,65); Reattivi: 0,43 (0,33-0,61)] (**Tabelle 4.3 e 4.4; Figura 4.6**). Quindi, nonostante la GGT Totale rientri nei valori di normalità, l'analisi delle frazioni di GGT ha permesso di mettere in risalto una diversa distribuzione dell'attività di questo enzima nelle quattro frazioni circolanti dei pazienti affetti

da epatite HCV, evidenziata dalla riduzione del valore del rapporto b-GGT/s-GGT. Ciò suggerisce che il rapporto b-GGT/s-GGT sia un sensibile indicatore dell'alterazione del tessuto epatico in corso di epatopatia virale.

I dati raccolti, inoltre, confermano le osservazioni di uno studio precedente (39), condotto nel laboratorio dove ho svolto il lavoro di tesi. Infatti, nel suddetto studio si dimostra che elevati livelli della frazione b-GGT caratterizzano il profilo di eluizione dell'attività di GGT in pazienti con steatosi epatica non alcolica (NAFLD) a differenza della frazione s-GGT che risulta più elevata in pazienti affetti da epatite virale C (CHC) (39). Di conseguenza, il rapporto delle frazioni b-GGT/s-GGT mostra la maggiore specificità per la diagnosi differenziale tra NAFLD e CHC (39).

L'ultima variabile che è stata presa in considerazione è la differenza tra il volume di eluizione della frazione f-GGT e il volume di eluizione della frazione s-GGT, espresso in millilitri. Le frazioni b-GGT e f-GGT sono costituite rispettivamente da esosomi e dalla forma solubile dell'enzima, perciò la loro composizione e massa molecolare costante si rispecchia nella bassa variabilità inter-cromatogramma del volume di eluizione delle frazioni (n=129; CV% 1,4% e 0.8%, rispettivamente). Perciò il volume di eluizione di queste due frazioni, in particolare quello di f-GGT, può essere considerato come un punto di riferimento per confrontare cromatogrammi diversi.

Le frazioni m-GGT e s-GGT presentano, invece, una maggiore variabilità inter-cromatogramma del volume di eluizione (n=129; CV% 3% e 1,9%, rispettivamente); ciò è

probabilmente dovuto ad una maggiore variabilità della composizione molecolare delle due frazioni. Dati ottenuti nel laboratorio dove ho svolto la tesi, suggeriscono che le frazioni m-GGT e s-GGT siano costituite da micelle di acidi biliari e, molto probabilmente, il numero di molecole di acidi biliari o il numero di proteine GGT associate ad essi può variare riflettendosi in una maggiore variabilità della massa molecolare e del volume di eluizione di queste due frazioni.

Il volume di eluizione dipende proprio dalla massa molecolare della frazione e perciò potrebbe essere considerato come un marcatore surrogato della variabilità in termini di qualità e composizione delle frazioni di GGT. Per diminuire la variabilità tra i cromatogrammi, invece di considerare il valore assoluto del volume di eluizione della frazioni di s-GGT, ho utilizzato la differenza tra i volumi di eluizione di f-GGT e s-GGT, descrivendo così la distanza del picco s-GGT da f-GGT. Maggiore è la massa molecolare di s-GGT, minore sarà il suo volume di eluizione e, quindi, sarà maggiore la differenza (distanza) tra i volumi di eluizione di f- e s-GGT.

Tale differenza è stata calcolata in tutti i soggetti facenti parte dei tre gruppi e, successivamente, ho calcolato la media e la deviazione standard. In **Figura 4.7** è riportata la distribuzione dei valori nei tre gruppi. I valori di media e deviazione standard nei tre gruppi sono: Controllo $2,61 \pm 0,34$ ml; Reattivi $2,59 \pm 0,30$ ml; Positivi $2,66 \pm 0,30$ ml. Non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra questi valori. Di conseguenza, l'epatite HCV non sembrerebbe essere associata alla produzione di una frazione s-GGT con composizione diversa rispetto a quella presente nei soggetti sani. Tuttavia sarà interessante

approfondire questo dato in studi successivi su coorti di pazienti e soggetti sani più numerose.

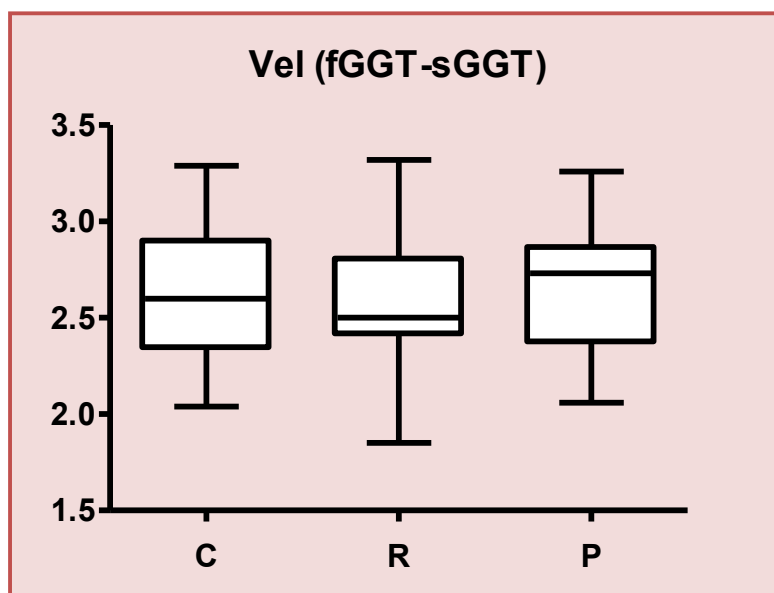


Figura 4.7. Distribuzione dei valori della differenza tra il volume di eluizione delle frazioni f-GGT e s-GGT nei tre gruppi: Controlli (C), Reattivi (R) e positivi (P). Il rettangolo è delimitato dal 25° e dal 75° percentile, il segmento al suo interno rappresenta il valore di mediana e i segmenti esterni sono delimitati dal valore minimo e massimo osservati.

4.3 Analisi di correlazione nel gruppo dei positivi

Per verificare se i livelli dei marcatori sierici di danno epatico (ALT, AST, GGT totale) e le quattro frazioni di GGT siano associati anche all'entità della replicazione virale ho effettuato, nel gruppo dei Positivi, l'analisi di correlazione di Spearman tra la variabile "Viremia" e i suddetti marcatori. Nella **Tabella 4.5** sono riportati i risultati dell'analisi di correlazione. All'aumentare della viremia e quindi della replicazione virale, ci possiamo attendere anche un incremento del danno epatocellulare; infatti ALT, AST e GGT totale mostrano una correlazione positiva con la viremia. In base ai dati di letteratura e a quelli descritti nel paragrafo precedente, si ipotizza che valori elevati della frazione s-GGT e bassi livelli del rapporto b-GGT/s-GGT siano un indice di danno epatocellulare; infatti la prima correla positivamente e il secondo negativamente con la viremia. Anche m-GGT e f-GGT presentano un'associazione positiva con i valori di viremia, sebbene di entità minore rispetto ad s-GGT e al rapporto b-GGT/s-GGT. La frazione b-GGT, invece, non presenta una correlazione significativa, confermando che la frazione b-GGT non è un marcatore di danno epatocellulare ma piuttosto di alterazioni dello stato metabolico/funzionale degli epatociti, come suggerito dallo studio sui pazienti con NAFLD (39).

Tabella 4.5. Analisi di correlazione di Spearman tra i valori di viremia (espressi in UI/ml) nel gruppo dei Positivi e le variabili riportate in tabella.

	r	95% IC	P
ALT U/L	0,427	0,132 - 0,653	0,0048
AST U/L	0,468	0,186 - 0,678	0,0016
GGT Tot U/L	0,431	0,141 - 0,653	0,0039
b-GGT U/L	0,291	-0,020 - 0,550	n.s.
m-GGT U/L	0,304	-0,005 - 0,560	0,0476
s-GGT U/L	0,432	0,142 - 0,653	0,0039
f-GGT U/L	0,388	0,089 - 0,622	0,0102
b-GGT/s-GGT	-0,408	-0,637 - -0,114	0,0066

r: coefficiente di correlazione; IC: intervallo di confidenza; n.s.: non significativo

4.4 Il gruppo dei Positivi: analisi statistiche tra il sottogruppo con viremia zero e il sottogruppo con viremia positiva.

Il gruppo dei Positivi è costituito da pazienti positivi alla ricerca di RNA di HCV e/o alla presenza di anticorpi contro HCV. Possiamo quindi suddividere tale gruppo in due sottogruppi: l'uno formato dai pazienti con viremia zero (n=14) e l'altro, formato dai pazienti con viremia positiva (n=29). Tale suddivisione può essere utile per valutare se esistono differenze significative tra i due sottogruppi rispetto all'attività di GGT. Nella **Tabella 4.6** sono riportati e confrontati, con il test statistico non parametrico di Mann-Whitney, i livelli di ALT, GGT totale e delle sue frazioni nei due sottogruppi.

Tabella 4.6. Valori di ALT, GGT totale e delle frazioni nei sottogruppi dei pazienti con epatite HCV con valori di viremia nulli o positivi (>0)

	Viremia 0 (n=14)	Viremia >0 (n=29)	P
ALT (U/L)	15,0 (12,0 – 22,0)	66,0 (37,5 – 126,5)	0,0170
GGT Tot (U/L)	16,5 (8,3 – 23,3)	39,2 (26,8 – 51,6)	0,0060
b-GGT (U/L)	1,4 (0,8 – 3,1)	2,8 (2,0 – 4,2)	0,0177
m-GGT (U/L)	0,3 (0,2 – 1,0)	1,2 (0,7 – 2,0)	0,0070
s-GGT (U/L)	5,3 (2,4 – 10,3)	22,8 (13,4 – 33,1)	0,0002
f-GGT (U/L)	7,6 (5,1 – 9,1)	10,5 (8,4 – 12,5)	0,0115
b-GGT/s-GGT	0,26 (0,20 – 0,49)	0,13 (0,10 – 0,19)	0,0150

I dati sono riportati come mediana (25° - 75° percentile). Statistica: Mann-Whitney

Come possiamo notare, il sottogruppo viremia zero presenta, sia per la variabile GGT tot che per la variabile ALT, valori di mediana e percentili più bassi rispetto al sottogruppo viremia positiva; ciò è dovuto al fatto che il sottogruppo con viremia positiva, avendo replicazione virale in atto, presenta un maggiore danno epatico e conseguente maggior rilascio di GGT ed

ALT in circolo. Anche le varie frazioni di GGT presentano valori significativamente diversi nei due sottogruppi ad evidenziare come, la presenza o meno di replicazione virale, possa incidere sul profilo di attività delle frazioni; in particolare la frazione s-GGT mostra un'attività molto più elevata nel sottogruppo con viremia positiva. Ciò è in linea con i dati riportati in letteratura e in questa tesi, i quali indicano che, in pazienti affetti da epatite virale C, la frazione s-GGT è un indice di danno epatocellulare. Come già detto precedentemente, l'aumento della frazione s-GGT comporta una concomitante riduzione del rapporto b-GGT/s-GGT; i valori di tale variabile sono più bassi nel sottogruppo con viremia positiva rispetto al sottogruppo con viremia zero. Questi ultimi, a loro volta, presentano un valore del rapporto b-GGT/s-GGT significativamente più basso rispetto ai soggetti Controllo [mediana (25° - 75° percentile): 0.26 (0.20 – 0.49) vs. 0.42 (0.35 – 0.65), rispettivamente; test di Mann-Whitney: $P = 0.02$ **Tabella 4.7**] e va sottolineato che, nel confronto tra il sottogruppo Viremia zero e il gruppo controllo, tra tutte le variabili analizzate (ALT, GGT Tot, b-GGT, m-GGT, s-GGT, f-GGT, b-GGT/s-GGT), solo il rapporto b-GGT/s-GGT presenta differenze significative. Ciò ci porta a ipotizzare che, nonostante nel sottogruppo viremia zero non si abbia, al momento, replicazione virale, il fatto di essere comunque venuti a contatto con il virus HCV fa sì che persistano nel tempo differenze nel profilo di attività delle varie frazioni di GGT e, di conseguenza, nel rapporto b-GGT/s-GGT. Il contatto con il virus lascia, quindi, delle alterazioni permanenti al tessuto epatico; una sorta di "impronta" che si riflette in una diversa distribuzione dei valori delle frazioni di GGT, rispetto alla distribuzione di valori di chi, con il virus, non è mai venuto a contatto e della quale il rapporto b-GGT/s-GGT è un sensibile indicatore.

Tabella 4.7. Valori di ALT, GGT totale e delle frazioni nel gruppo Controllo e nel sottogruppo Viremia zero.

	Controlli (n=43)	Viremia 0 (n=14)	P (Mann-Whitney)
ALT (U/L)	17,0 (15 - 23)	15,0 (12,0 – 22,0)	n.s
GGT Tot (U/L)	15,8 (12,1 – 19,27)	16,5 (8,3 – 23,3)	n.s
b-GGT (U/L)	1,9 (1,2 – 3,3)	1,4 (0,8 – 3,1)	n.s
m-GGT (U/L)	0,4 (0,3 – 0,6)	0,3 (0,2 – 1,0)	n.s
s-GGT (U/L)	4,7 (2,4 – 6,9)	5,3 (2,4 – 10,3)	n.s
f-GGT (U/L)	9,1 (7,2 – 10,5)	7,6 (5,1 – 9,1)	n.s
b-GGT/s-GGT	0,42 (0,35 – 0,65)	0,26 (0,20 – 0,49)	0.02

I dati sono riportati come mediana (25° - 75° percentile). Statistica: Mann-Whitney

I soggetti che risultano reattivi ai test di screening per i virus HCV e HBV non presentano alcuna alterazione del rapporto b-GGT/s-GGT (*cf.* **Tabella 4.3 e 4.4**). Ciò ci induce a pensare che la causa di reattività non sia dovuta ad un'ipotetica infezione virale subclinica, ma alla presenza di un interferente in circolo di altra natura.

4.5 Analisi ROC

L'analisi dei dati raccolti suggerisce che, tra i valori di GGT totale e delle sue frazioni, il rapporto b-GGT/s-GGT è la variabile che potrebbe meglio discriminare i soggetti con danno epatico, in questo caso i pazienti del gruppo dei Positivi, dai soggetti sani (Controlli) o apparentemente tali (Reattivi). Per verificare questo aspetto ho utilizzato l'analisi ROC per valutare e confrontare la capacità delle variabili GGT totale, s-GGT e b-GGT/s-GGT di discriminare i tre gruppi di questo studio l'uno dall'altro (**Tabella 4.8 e Figura 4.8**). Dall'analisi emerge che le variabili considerate non sono assolutamente in grado di distinguere i soggetti Reattivi dai Controlli, mentre si conferma che il rapporto b-GGT/s-GGT

è la variabile associata con il maggiore valore di area sottesa alla curva ROC e, perciò, è quella che meglio discrimina tra i soggetti Positivi, con epatite virale HCV, dai soggetti sani del gruppo Controllo e Reattivi.

Tabella 4.8. Valori area sottesa alla curva (95% IC) ROC per le variabili riportate in tabella.

	Controlli vs. Reattivi	Controlli vs. Positivi	Reattivi vs. Positivi
GGT totale	0,518 (0,407 – 0,627) ^{n.s.}	0,757 (0,652 – 0,843) [‡]	0,703 (0,595 – 0,797) [†]
s-GGT	0,508 (0,398 – 0,618) ^{n.s.}	0,802 (0,702 – 0,880) [‡]	0,756 (0,595 – 0,797) [†]
b-GGT/s-GGT	0,501 (0,391 – 0,611) ^{n.s.}	0,847 (0,754 – 0,916) [‡]	0,843 (0,748 – 0,912) [‡]

Significatività dell'area n.s.: non significativa; †<0,001; ‡<0,0001

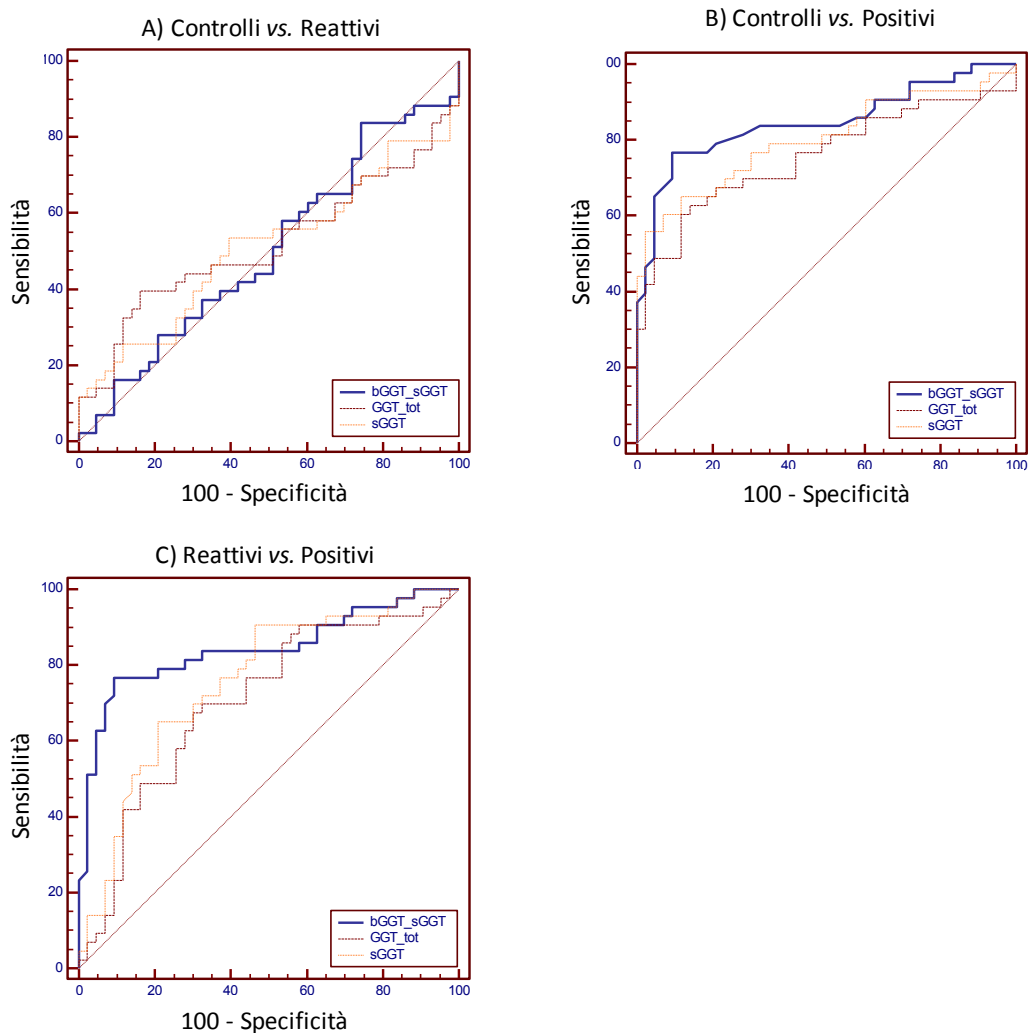


Figura 4.8. Grafici dell'analisi ROC per le coppie: A) Controlli – Reattivi; B) Controlli – Positivi; C) Reattivi – Positivi. Le variabili considerate in ciascuno caso sono la GGT totale (linea marrone tratteggiata), la frazione s-GGT (linea arancione a puntini), il rapporto b-GGT/s-GGT (linea blu continua).

5. CONCLUSIONI

L'analisi delle varie frazioni di GGT svolte sui tre gruppi oggetto di questo studio non permette di distinguere il gruppo Controllo dal gruppo dei Reattivi.

I dati raccolti suggeriscono che l'analisi delle frazioni di GGT abbia un potenziale diagnostico maggiore rispetto alla sola valutazione della GGT Totale e, in particolare, il rapporto b-GGT/s-GGT è l'indice più sensibile di un'alterazione del tessuto epatico in corso di epatopatia virale; infatti:

- 1) Risulta ridotto in pazienti HCV ma in apparente remissione (Sottogruppo Viremia zero).
- 2) E' associato all'entità della replicazione virale, diminuendo all'aumentare della viremia e, quindi, del danno epatocellulare (Analisi di correlazione).
- 3) Tra le varie frazioni GGT analizzate si dimostra come la variabile con il più alto potere diagnostico e, quindi, la migliore nella capacità di discriminazione dei Positivi (affetti) rispetto agli altri due gruppi (sani ed apparentemente tali). (Analisi ROC).
- 4) Nonostante la variabile b-GGT/s-GGT abbia il più alto potere diagnostico nel distinguere i Positivi dai Controlli e dai Reattivi, non è invece assolutamente in grado di discriminare il gruppo dei Controlli dal gruppo dei Reattivi.

Concludendo, posso affermare che l'analisi delle frazioni, seppur utile, non mi ha permesso di distinguere il gruppo dei Reattivi dal gruppo Controllo e che, quindi, la causa di reattività che tali soggetti dimostrano nei confronti dei test di screening non va

ricercata in una condizione di infezione virale subclinica (che, se presente, sarebbe stata messa in evidenza da una diversa distribuzione dei valori delle frazioni GGT) ma, forse, nella presenza in circolo di un interferente di altra natura.

6. BIBLIOGRAFIA

Introduzione

(1) Mark E. Brecher, MD Chief Editor Chapel Hill, NC. Technical Manual, 15^{ma} edizione Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide, Capitolo 28: Le malattie trasmesse con la trasfusione.

(2) So Young Kwon and Chang Hong Lee. *“Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection”*. Korean J Hepatol. 2011. 17(2): 87–95.

(3) Jae Young Jang and Raymond T. Chung. *“Chronic Hepatitis C”*. Gut Liver. 2011; 5(2): 117–132.

(4) Theodore Sy and M. Mazen Jamal. *“Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection”*. Int J Med Sci. 2006; 3(2): 41–46.

(5) Jay H. Hoofnagle. *“Hepatitis C: The Clinical Spectrum of Disease”*. Hepatology Vol. 26, No. 3, Suppl. 1, 1997.

(6) Legge 21 Ottobre 2005, n. 219 e successive modifiche: *Nuova disciplina delle attività trasfusionali e della produzione nazionale degli emoderivati*. (Pubblicata nella Gazzetta Ufficiale 27 Ottobre 2005, n. 251)

Ministero della salute: Decreto 3 Marzo 2005. *Protocolli per l'accertamento della idoneità del donatore di sangue e di emocomponenti*.

(7) Tate SS, Meister A *“Gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects”*. Mol Cell Biochem. 1981, 39:357-68

(8) Curthoys NP, Hughey RP. *“Characterization and physiological functions of rat renal Gamma-Glutamyl transpeptidase”*. Enzyme. 1979, 24: 383-403.

(9) Finidori J, Laperche Y, Haguenaer-Tsapis R, et al. *“In vitro biosynthesis and membrane insertion of gamma-glutamyl transpeptidase”*. J Biol Chem. 1984,259:4687-90.

(10) Castonguay R, Halim D, Morin M, et al. *“Kinetic characterization and identification of the acylation and glycosylation sites of recombinant human gamma-glutamyltranspeptidase”*. Biochemistry 2007,46 :12253-62

- (11) Ikeda Y, Fujii J, Anderson ME, et al. "Involvement of Ser -451 and Ser-452 in the catalysis of human gamma- glutamyltranspeptidase". J Biol Chem. 1995;270:22223-8.
- (12) Gardell SJ, Tate SS. "Latent proteinase activity of Gamma- Glutamyl transpeptidase light subunity". J Biol Chem 1979, 254: 4942-5.
- (13) Garcion E, Sindji L, Leblondel G, et al. "1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes". J Neurochem. 1999;73:859-66.
- (14) Hanigan MH, Frierson HF Jr. "Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue". J Histochem Cytochem. 1996;44:1101-8.
- (15) Khalaf MR, Hayhoe FG. "Cytochemistry of - glutamyltransferase in haemic cells and malignancies". Histochem J. 1987;19:385-95.
- (16) Grisk O, Kuster U, Ansorge S. "The activity of gamma- glutamyl transpeptidase (gamma-GT) in populations of mononuclear cells from human peripheral blood". Biol Chem Hoppe Seyler. 1993;374:287-90.
- (17) Sener A, Yardimci T. "Activity determination, kinetic analyses and isoenzyme identification of gamma-glutamyltransferase in human neutrophils". J Biochem Mol Biol. 2005;38:343-9.
- (18) Huseby NE, Ingebretsen OC. "The level of gamma- glutamyltransferase in serum, effect of carbohydrate heterogeneity on clearance rate". Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1993;215:93-100.
- (19) Szczeklik et al. "Activity of serum gamma-glutamylotranspeptidase as a new enzymatic test in liver diseases. Comparison with other enzymatic tests". Pol.Tyc.Lek 1961,16:503-10.
- (20) Battezzati PM, Podda M, Bruno S, et al. "Factors predicting early response to treatment with recombinant interferon Alpha 2° in chronic non-A, nonB epatiti. Preliminary report of long-term trial". Ital J Gastroenterol 1992. 24: 481-4.
- (21) Paolicchi.A, Marchi.S, Petruccelli.S, Ciancia.S, Malvakli and Pompella.A "Gamma- glutamyltransferase in fine-needle liver biopsies of subjects with chronic hepatitis C". Journal of Viral Hepatitis, 2005,12:269–273.
- (22) Sacchetti L, Castaldo G, Fortunato G, et al. "Improved procedure for measuring gamma- glutamyltransferase isoenzymes in serum". Clin Chem 1988,34:419-22.

- (23) Bellini M, Tumino E, Giordani R, et al. "Serum γ -glutamyl-transpeptidase isoforms in alcoholic liver disease". *Alcohol and Alcoholism*. 1997;32:259-66.
- (24) Wenham PR, Horn DB, Smith AF. "Multiple forms of gamma glutamyltransferase: a clinical study". *Clin Chem* 1985,31:569-73.
- (25) Franzini M, Bramanti E, Ottaviano V et al. "A high performance gel filtration chromatography method for gammaglutamyltransferase fraction analysis". *Anal Biochem* 2008,374:1-6.
- (26) Franzini M, Ottaviano V, Fierabracci V, Bramanti E, Zyw L, Barsacchi R, Scatena F, Boni C, Mammini C, Passino C, Pompella A, Emdin M, Paolicchi A. "Fractions of plasma gammaglutamyltransferase in healthy individuals: reference values". *Clin Chim Acta* 2008,394:188-9.
- (27) Huseby NE. "Multiple form of gammaglutamyltransferases: Biochemical characterization". *AdvBiochem Pharmacol* 1982,280:220-34.
- (28) Huseby NE. "Multiple forms of serum gamma-glutamyltransferase. Association of the enzyme with lipoproteins". *Clin Chim Acta* 1982,124:103-12.
- (29) Huseby NE. "Hydrophilic form of γ -glutamyltransferase: proteolytic formation in liver homogenates and its estimation in serum". *Clin Chim Acta* 1982,124:113-21.
- (30): Franzini M., Corti A., Mammini C. " γ -Glutamyltransferasi: biochimica clinica e fisiopatologia umana". *Biochimica clinica*, 2009, vol. 33, n. 1.
- (31) Kazemi-Shirazi L, Endler G, Winkler S, et al. "Gamma glutamyltransferase and long-term survival: is it just the liver?". *Clin Chem*. 2007;53:940-6.
- (32) Jousilahti P, Rastenyte D, Tuomilehto J. "Serum gammaglutamyltransferase, self-reported alcohol drinking, and the risk of stroke". *Stroke* 2000,31:1851.
- (33) Wannamethee G, Ebrahim S, Shaper AG. "Gamma- glutamyltransferase: determinants and association with mortality from ischaemic heart disease and all causes". *Am J Epidemiol* 1995,142:699-708.
- (34) Ruttman E, Brant LJ, Concin H, Diem G, Rapp K, Ulmer H. "Gamma-glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality. An investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults". *Circulation* 2005,112:2130-7.
- (35) Amoroso G, Van Boven AJ, Crijns HJ. "Drug therapy or coronary angioplasty for the treatment of coronary artery disease: new insights". *Am Heart J*. 2001;141:S22 .

- (36) Dominici S, Paolicchi A, Lorenzini E, et al. *"Gamma- glutamyltransferase-dependent prooxidant reactions: a factor in multiple processes"*. Biofactors. 2003;17:187-98.
- (37) Libby P, Theroux P. *"Pathophysiology of coronary artery disease"*. Circulation. 2005;111:3481-8.
- (38) Franzini.M , Corti.A , Martinelli.B , Del Corso.A , Pompella.A, Paolicchi.A, Emdin.M, Parenti.G, Glauber.M. *"Glutamyltransferase activity in human atherosclerotic plaques- Biochemical similarities whit the circulating enzyme"*. Atherosclerotic 2009,202:119-27.
- (39) Franzini M, Fornaciari I, Fierabracci V, Elawadi H, Bolognesi M, Maltinti S, Ricchiuti A, De Bortoli N, Marchi S, Pompella A, Passino C, Emdin M , Paolicchi A. *"Accuracy of b-GGT fraction for the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease"*. Liver int.2012,32:629-34.
- (43) Cordek DG, Bechtel JT, Maynard AT, Kazmierski WM, Cameron CE. *"Targeting the NS5A protein of HCV: an emerging option"*. Drugs Future. 2011;36(9):691-711.

Materiali e metodi

- (40) Pasquinelli Filippo. *"Diagnostica e tecniche di laboratorio"*. Capitolo 14: *"Metodi enzimoimmunologici"*.
- (41) ARCHITECT HBsAg Qualitative II; Abbott Laboratories 2011
- (42) ARCHITECT Anti-HCV; Abbott Laboratories 2009
- (44) INNO-LIA HCVScore; Innogenetics 2010
- (45) Procleix Ultrio Plus Assay; Gen-Probe Incorporated 2009
- (46) Keith Wilson, John Walker. *"Principles and Techniques of Practical Biochemistry"*; Capitolo 13: *"Chromatographic techniques"*.
- (47) ARCHITECT Anti-HBc II; Abbott Laboratories 2008
- (48) ARCHITECT Anti-HBc IgM; Abbott Laboratories 2003
- (49) ARCHITECT HBeAg; Abbott Laboratories 2008
- (50) ARCHITECT Anti-HBe; Abbott Laboratories 2004

Ringraziamenti

Tra le varie persone che, al termine del mio percorso universitario, mi sento di dover ringraziare occupano i primi posti all'apice della lista i miei due relatori: il Professor Aldo Paolicchi e la Dottoressa Rosaria Bonini. E' grazie alla disponibilità del professor Paolicchi che mi è stato permesso di svolgere l'internato di tesi da pendolare e senza rinunciare alla mia attività lavorativa; sono stati i suoi consigli a spronarmi nella ricerca di una possibile attività di tesi da svolgere nella mia amata Garfagnana ed, è stato così, che ho potuto conoscere la Dottoressa Rosaria. A lei, il mio più grande e affettuoso ringraziamento, per la disponibilità e gentilezza che mi ha sempre mostrato, sia nelle fasi iniziali, quando ancora il progetto di tesi era solo un' ipotesi da valutare, sia in tutte le fasi successive. Grazie per i pomeriggi passati nello studio di Castelnuovo, sempre pronta a rispondere a qualsiasi mia richiesta e a cercare di aiutarmi in tutti i modi a sua disposizione. Un sentito ringraziamento alla Dottoressa Francesca Pacini, figura indispensabile nella fase di ricerca dei campioni e delle relative analisi; grazie per avermi sempre aiutata cercando di fornirmi tutto il materiale necessario per la stesura di alcune parti della tesi e per avermi dedicato tempo, nonostante gli impegni lavorativi. Un doveroso grazie ai tecnici di laboratorio della Medicina Trasfusionale di Lucca, in particolare alla Signora Paola che più volte si è vista "costretta" a darmi una mano durante le mie ricerche. Un saluto alla Signora Carla, Garfagnina come me, e al Dottor Roberto Bellerio. Grazie per avermi accolta in reparto con tutto l'entusiasmo che vi caratterizza facendomi sentire a mio agio e mettendomi di buon umore. Agli apici della lista delle persone da ringraziare trova sicuramente un posto di rilievo la Dottoressa Maria Franzini; con lei ho svolto tutta la parte relativa alle analisi di laboratorio ed è grazie ai suoi consigli e a tutto quello che è stata disposta a spiegarmi e ad insegnarmi, che mi è stato possibile scrivere la maggior parte del mio lavoro di tesi. Un amichevole ringraziamento anche alla Dottoressa Silvia che mi ha aiutata svariate volte nelle giornate di laboratorio.

Annalisa