

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**V Seminario di aggiornamento sull'epatite da virus HCV  
e nuovi virus potenzialmente epatitici:  
diagnosi, epidemiologia, prevenzione e terapia**

Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 20-21 dicembre 2000

Atti a cura di Maria Rapicetta  
*Laboratorio di Virologia*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**00/32**

Istituto Superiore di Sanità

**V Seminario di aggiornamento sull'epatite da virus HCV e nuovi virus potenzialmente epatitici: diagnosi, epidemiologia, prevenzione e terapia. Istituto Superiore di Sanità, Roma, 20-21 dicembre 2000.**

Atti a cura di Maria Rapicetta

2000, iv, 193 p. Rapporti ISTISAN 00/32 (in italiano/inglese)

Sono trattate le più recenti acquisizioni disciplinari, per quanto concerne gli aspetti virologici e patogenetici dell'infezione da HCV, in particolare in relazione agli studi sull'agente virale, sulle sue caratteristiche genomiche e variabilità sul ruolo della risposta immunitaria dell'ospite. Le trattazioni sono estese alle attuali conoscenze sui nuovi virus potenzialmente correlati ad infezione epatica. Sono, inoltre, trattati i progressi raggiunti nel campo dell'epidemiologia, della diagnostica e della terapia dell'infezione. Tali dati hanno un notevole impatto in vari settori di interesse medico e sanitario quali quelli relativi alla terapia e alla prevenzione dell'infezione.

*Parole chiave:* Formazione, Infezioni, Virus epatite C

Istituto Superiore di Sanità

**V Seminar on developments in HCV hepatitis virus and new putative hepatitis viruses: diagnosis, epidemiology, prevention and therapy. Istituto Superiore di Sanità, Rome, December 20-21, 2000.**

Proceedings edited by Maria Rapicetta

2000, iv, 193 p. Rapporti ISTISAN 00/32 (in Italian/English)

The latest achievements from the studies on HCV genome structure and variability and on the role of immune host response are reported, as well as, progresses of knowledge on epidemiology, developments in diagnostic tools and therapy perspectives. The achievements on new viruses potentially related to hepatitis infections are also included. Such data have greatly impacted on various areas of medicine and health structures as concerns the infection therapy and prevention.

*Key words:* Hepatitis C virus, Infections, Training

Si ringrazia Sabrina Tocchio, Luigia Mauro e Cinzia Bisegna per la collaborazione tecnica prestata per la realizzazione del presente rapporto.

## INDICE

Introduzione	
M. Rapicetta .....	1
<b>Il virus HCV e virus emergenti potenzialmente epatitici</b>	
(moderatori: M. Rapicetta, A. Zanetti)	
Biological activities of HCV envelope proteins	
T. Miyamura .....	5
Biologia e patogenesi dei virus epatite G e TT	
F. Maggi, M. L. Vatteroni, G. Freer, M. Pistello, M. Bendinelli.....»	6
Caratterizzazione biologica e molecolare dei virus SEN: una famiglia di virus lontanamente correlati all'isolato originale di TTV	
A. Sottini, S. Mattioli, G. Fiordalisi, G. Mantero, L. Imberti, D. Moratto, D. Primi.....»	12
<b>I marcatori di infezione, replicazione e malattia</b>	
(moderatori: M. Rapicetta, F. Bonino)	
Metodi di rilevamento di HCV-RNA mediante PCR	
G. Colucci.....»	21
Single testing of HIV-1 and HCV genomes by a transcription mediated amplification method	
P. Moncharmont .....	27

Immunoassay systems for circulating HCV core protein in the detection and diagnosis of HCV infection S. R. Lee, J. McHutchison, T.-L. Fong, P. Niven, J. Peterson, D. Baggett, G. Green .....	31
Analisi dinamica della risposta anticorpale: significato clinico M. R. Brunetto, B. Coco, F. Oliveri, P. Ciccorossi, P. Colombatto, A.M. Maina, G. Moscato, F. Bonino .....	35
<b>Lo screening del sangue: concetti e metodologie</b> (moderatori: M. Orlando, A.L. Massaro)	
Strategia per la valutazione e la riduzione del rischio residuo di epatite C associata alla trasfusione C. Velati, A. Zanetti, V. Carreri .....	43
Risultati dello studio di fattibilità per l'applicazione delle tecniche NAT allo screening del sangue M. Miceli, P. Ghiazza, E. Mannella, A. L. Massaro, M. Orlando, M. Rapicetta, G. Gentili, P. Verani .....	48
Controllo di qualità dei saggi di amplificazione genica nei laboratori diagnostici S. Di Biase, M. Brunetto, D. Labella, N. Di Pietro, V. Salotti, U. Baicchi, P. Palla, F. Bonino, Gruppo di Studio Italiano per il Controllo di Qualità.....	60
<b>Immunità e patogenesi</b> (moderatori: V. Barnaba, P. Pontisso)	
Prospettive per un vaccino per l'epatite C S. Abrignani.....	71

Ruolo delle risposte T linfocitarie nella patogenesi dell'infezione da virus dell'epatite C C. Ferrari, G. Missale, S. Urbani, A. Penna, M. Malpeli, C. Boni, A. Cavalli, J. Uggeri.....»	77
Meccanismi molecolari e patogenesi dell'epatocarcinoma M. Levrero .....»	83
Implicazioni biologiche e cliniche della quasispecie virale P. Farci .....»	94
 <b>Le manifestazioni extraepatiche</b> (moderatori: F. B. Bianchi, A. Smedile)	
La crioglobulinemia mista: storia naturale ed approcci terapeutici C. Mazzaro, G. Pozzato .....»	105
Glomerulonefrite HCV-correlata: stato dell'arte G. Pozzato, C. Mazzaro .....»	117
Infezione da HCV e disordini linfoproliferativi A. L. Zignego, R. Riyahi, F. Giannelli, C. Ferri, P. Gentilini.....»	125
 <b>Scenari presenti e futuri delle infezioni da HCV in Italia</b> (moderatori: E. Sagnelli, N. Caporaso)	
Epidemiologia delle infezioni acute da virus epatitici a trasmissione parenterale A. Mele, E. Spada.....»	141

Le epatopatie croniche da HCV	
G. B. Gaeta, G. Starnaiuolo .....	148
Influenza di cofattori nella storia naturale dell'infezione da HCV	
M. Chiaramonte .....	154
<b>Terapia dell'infezione da HCV</b>	
(moderatori: A. Craxì, F. Piccinino)	
La terapia dell'epatopatia cronica da HCV	
A. Alberti, S. Boccato, L. Benvegnù .....	165
Resistenza all'interferone: fattori implicati	
G. Raimondo, G. Squadrito, T. Pollicino .....	171
Trattamento della cirrosi epatica	
M. Colombo, F. De Filippi .....	176
Un nuovo modello per rappresentare la dinamica delle interazioni virus-ospite nei pazienti con epatite cronica C	
P. Colombatto, L. Civitano, M. R. Brunetto, F. Oliveri, B. Coco, A. M. Maina, P. Ciccorossi, F. Bonino .....	182
Epatite cronica C: nuove prospettive terapeutiche	
M. Rizzetto, V. Barbon.....	184
Situazione dei trapianti di fegato in Italia	
P. Burra, M. Angelico, A. Ascione, A. Smedile, M. Rizzetto .....	188

## INTRODUZIONE

Maria Rapicetta

*Laboratorio di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Le ricerche messe in atto per l'identificazione del virus dell'epatite di tipo C, responsabile della maggior parte delle epatiti di tipo non-A, non-B, hanno costituito all'inizio degli anni '90 un autentico "tour de force" della moderna biologia molecolare.

La caratterizzazione del genoma virale e della struttura e funzione dei vari prodotti genici ha prodotto considerevoli progressi nelle conoscenze sul ciclo naturale virale e sulla patogenesi della malattia epatica correlata. Le conoscenze acquisite potranno contribuire allo sviluppo di un vaccino efficace e di appropriate e specifiche terapie. Il perfezionamento degli stessi approcci di biologia molecolare ha permesso l'identificazione di altri agenti virali. Il relativo contributo nell'ambito dell'eziopatogenesi delle malattie epatiche ad eziologia non definita è, tuttavia, non chiaro.

Recentemente notevoli sforzi sono stati dedicati da parte delle ditte produttrici di diagnostici alla standardizzazione dei metodi di rilevamento virale. E' stato ottenuto un buon grado di automazione accompagnato da elevati livelli di sensibilità, specificità e rapidità di rilevamento per l'utilizzazione sia a scopo diagnostico che a scopo di "screening" e di monitoraggio.

L'infezione da virus dell'epatite C è causa di malattia cronica. Il principale interrogativo riguarda le cause della persistenza virale nell'ospite in presenza di una risposta immunitaria specifica ed estesa a livello cellulare ed umorale. Le ricerche in sviluppo sono volte all'identificazione di possibili fattori genetici predisponenti alla spontanea eliminazione del virus. La definizione del ruolo della variabilità virale, anche nella regolazione della risposta al trattamento con Interferon- $\alpha$ , rappresenta un altro importante aspetto delle attuali ricerche come pure la definizione di un approccio ottimale per lo sviluppo di un vaccino.

Questo V Seminario di Aggiornamento affronta i principali temi nei settori della patogenesi, Storia Naturale ed Epidemiologia dell'HCV e riporta i risultati di studi su tematiche applicative "ad hoc" pianificati anche a livello Nazionale. Le trattazioni sono estese alle attuali conoscenze sui nuovi virus potenzialmente correlati ad infezione epatica ed inoltre un particolare spazio è stato dedicato alle possibili manifestazioni extraepatiche di malattia. Un contributo alle tematiche affrontate nel convegno è anche derivato dalle ricerche messe in atto in Italia nell'ambito del Progetto Nazionale Epatiti Virali promosso e coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità e specificamente dedicato al tema "Eziopatogenesi e diagnosi delle infezioni da virus dell'epatite".

**IL VIRUS HCV E VIRUS EMERGENTI POTENZIALMENTE EPATITICI**

Moderatori: Maria Rapicetta, Alessandro Zanetti

## **BIOLOGICAL ACTIVITIES OF HCV ENVELOPE PROTEINS**

Tatsuo Miyamura (a), S.Takikawa (a), Y. Matsuura (b)

(a) Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo.

(b) Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan

The genome of hepatitis C virus (HCV) encodes two envelope glycoproteins (E1 and E2). They form heterodimer on virion surface, and are likely to be responsible for receptor binding, membrane fusion and virus penetration.

To examine the cell fusion activity of HCV envelope proteins, we have established a sensitive cell fusion assay based on the activation of a reporter gene. The chimeric HCV E1 and E2 proteins consist of the ectodomain of E1 or E2 proteins and the transmembrane and cytoplasmic domains of vesicular stomatitis virus (VSV) G glycoprotein were expressed on the cell surface. Cells expressing the chimeric envelope proteins and T7 RNA polymerase were co-cultured with the various target cell lines transfected with a reporter plasmid encoding luciferase gene under the T7 promoter. After co-cultivation, the cell fusion activity was quantitatively determined by the expression of luciferase in the co-cultured cells. The induction of cell fusion requires both of the chimeric E1 and E2 proteins with low pH-dependent manner.

Then we constructed pseudotype VSV possessing either one or both of the chimeric HCV E1 and E2 proteins instead of its own envelope glycoprotein. The pseudotype virus possessing both of the chimeric E1 and E2 proteins exhibited significantly higher susceptibility to HepG2 cells than that possessing either of the glycoproteins individually. Anti-VSV polyclonal antibodies did not neutralize the infection of the pseudotype VSV. Treatment of HepG2 cells with pronase, heparinase and heparitinase reduced the infectivity, but not with phospholipase C and sodium periodate. These results suggest that both E1 and E2 proteins are required for infection of HCV and that certain cell surface proteins and glycosaminoglycans may play important roles in the infection of HCV.

The above two assays provide useful system to screen cellular receptors and specific inhibitors.

## **BIOLOGIA E PATOGENESI DEI VIRUS EPATITE G E TT**

Fabrizio Maggi, Maria Linda Vatteroni, Giulia Freer, Mauro Pistello, Mauro Bendinelli  
*Sezione di Virologia, Dipartimento di Biomedicina, Università di Pisa, Unità Operativa di Virologia, Azienda Ospedaliera Pisana, e Centro di Riferimento per le Diagnostiche Virologiche Innovative della Regione Toscana, Pisa*

I grandi progressi nelle conoscenze sulle epatiti degli ultimi decenni hanno portato alla identificazione di 5 virus con spiccata epatopatogenicità (virus epatite A-E) e hanno dimostrato che anche adenovirus, citomegalovirus, enterovirus, parvovirus B19 ed altri agenti virali possono occasionalmente produrre danni epatici consistenti in assenza di o con scarse manifestazioni cliniche di altro tipo. Tuttavia, il 5-10% delle epatite acute e croniche restano di origine ignota, anche se appare molto probabile una loro origine virale. Il virus dell'epatite G (HGV), noto anche come virus GB tipo C, e il virus TT (TTV) sono stati scoperti a partire da sangue di soggetti con epatite non A-E. Ciò aveva, inizialmente, fatto sperare di aver individuato gli agenti di almeno alcune epatiti criptogenetiche. In realtà, sebbene il loro potenziale patogeno sia ben lungi dall'essere definitivamente chiarito, appare sempre più probabile che, a dispetto del nome assegnato ad uno di essi, ambedue questi virus di recente riconoscimento non rappresentino cause importanti di patologie epatiche.

### **Virus dell'epatite G (HGV) o virus GB tipo C**

Questo virus venne individuato a metà degli anni '90 da due gruppi indipendenti utilizzando approcci molecolari non molto diversi da quelli che pochi anni prima avevano permesso di caratterizzare il genoma di HCV. Presenta forti analogie di organizzazione genomica e strutturali con i flavivirus, ma l'omologia aminoacidica con HCV è solo del 30% circa. La particella virale, sferica con diametro 40-60 nm e fornita di pericapside, contiene un RNA lineare a singolo filamento di circa 9,4 kb. Tale genoma, essendo a polarità positiva, viene direttamente tradotto in una unica grande catena aminoacidica, la quale dà poi luogo alle proteine mature, strutturali e non, sotto l'azione di proteasi virali e cellulari. Una caratteristica peculiare e ancora poco compresa di HGV è che il gene codificante per la proteina capsidica o è presente in forma tronca oppure, in alcuni ceppi, è del tutto assente. Come per HCV, l'analisi comparativa delle sequenze genomiche di molteplici isolati ha dimostrato la possibilità di suddividere HGV in differenti genotipi (almeno 5) a distribuzioni geografica in parte diversa.

Non conoscendosi substrati cellulari che ne rendano agevole lo studio in vitro, aspetti biologici e meccanismi replicativi di HGV sono ancora poco noti. Anche i rapporti che il virus instaura con l'ospite sono conosciuti solo superficialmente. L'analisi longitudinale di pazienti contagiatisi in seguito a trasfusioni o emodialisi ha

messo in evidenza che le infezioni primarie possono risolversi spontaneamente dopo la fase iniziale acuta oppure tendere alla cronicizzazione. Nella maggior parte dei casi, HGV compare nel plasma già entro due settimane dal contagio e qui, di regola, rimane dimostrabile mediante amplificazione genica per alcuni mesi. I soggetti che tendono a risolvere l'infezione sviluppano, entro qualche mese, una robusta risposta anticorpale verso la proteina pericapsidica E2. In effetti, la comparsa di anti-E2 è il più delle volte seguita, a distanza di qualche settimana, da clearance della viremia e apparente completa eradicazione del virus dall'ospite. Inoltre, negli individui che possiedono anti-E2 il rischio di reinfezioni appare estremamente limitato. Si deve, tuttavia, precisare che le risposte immuni anti-HGV sono ancora poco definite. Esistono, fra l'altro, dubbi sul significato protettivo degli anti-E2. In alcuni soggetti, viremia plasmatica e anti-E2 possono, infatti, coesistere per tempi troppo lunghi per essere spiegabili come fasi protratte di sierconversione, suggerendo così che gli effettori immuni decisivi per la risoluzione dell'infezione siano altri. Inoltre, studi sull'evoluzione intrapaziente del virus hanno accertato che, nell'ospite, HGV esiste sotto forma di quasispecie ma che, diversamente da quanto si osserva in HCV, questa è piuttosto stabile nel tempo e non appare soggetta a forti pressioni selettive anche nel corso delle infezioni croniche. Non è stato ancora appurato quale sia la proporzione di infezioni acute che progrediscono verso la cronicizzazione. Comunque, un decorso di questo tipo è stato osservato in molti pazienti. In tal caso, la risposta anticorpale anti-E2 non si sviluppa e la viremia rimane dimostrabile in modo continuo o intermittente per anni.

Durante le infezioni persistenti, il virus è stato riscontrato in sede epatica e in altri distretti del sistema reticoloendoteliale, come midollo osseo e milza, nonché nei linfomonociti periferici. Rimane, tuttavia, da accertare se questi siano i tessuti che ne sostengono la replica. In vitro, il virus si moltiplica poco o niente sia su linee cellulari continue che su colture primarie di epatociti e linfociti.

Anche se l'infezione è stata sperimentalmente trasmessa ad altri primati, l'uomo è l'unico ospite naturale conosciuto. HGV sembra capace di diffondere con relativa facilità. Gli studi epidemiologici hanno dimostrato che, sebbene con differenze geografiche significative, in genere l'1-2% della popolazione sana presenta il virus in circolo e il 3-20% possiede anticorpi antivirali. La trasmissione avviene sicuramente per via parenterale (alta prevalenza di viremia fra i politrasfusi), ma anche quella verticale madre-figli e quella sessuale sono ritenute probabili. Il genoma virale è stato ritrovato, sia pure a basso titolo, anche nella saliva e in pool di immunoglobuline, tuttavia non vi sono casi provati di contagio legati a questi materiali.

Comunque evolva nel tempo, l'infezione acuta non è mai stata collegata con certezza ad alcun quadro clinico definito. Riguardo al significato patogeno dell'infezione cronica, c'è un consenso crescente che essa non sia alla base di patologie a carico del fegato. Si sta, anzi, facendo strada la convinzione che HGV sia del tutto privo di potenzialità patogene. Tuttavia, la recente dimostrazione di uno spiccato tropismo per i tessuti emopoietici suggerisce nuove direzioni in cui indagare.

In assenza di un soddisfacente sistema di coltivazione in vitro e di saggi per la ricerca dell'antigene virale, gli unici approcci diagnostici disponibili sono la ricerca di anticorpi anti-E2, che dimostrano le infezioni pregresse più o meno remote, e la ricerca

del genoma virale, che é più informativa in quanto evidenzia le infezioni in atto. I saggi ELISA anti-E2 sono divenuti disponibili solo di recente, utilizzano proteina ricombinante e, nonostante alcuni miglioramenti, non appaiono ancora dotati di soddisfacente specificità (>2% di false positività). La ricerca del genoma viene generalmente effettuata su plasma o siero mediante RT-PCR e viene mirata alla regione non codificante 5', la quale é sufficientemente conservata da permettere l'impiego di primers universali. In ambito pratico, questa indagini vengono poco richieste per cui sono disponibili solo in alcuni laboratori. Quantificazione della viremia e genotipizzazione vengono in genere utilizzate a soli scopi di ricerca.

## **Virus TT**

Nel 1997, Nishizawa e collaboratori identificarono nel siero di un paziente con epatite non-A non-G post-trasfusionale una sequenza di DNA che risultò appartenere ad un nuovo agente virale e la cui presenza sembrò correlare con lo sviluppo della malattia. Nei pochi anni trascorsi dal suo riconoscimento, il virus - chiamato TT dal nome del paziente - é stato intensamente studiato per definirne proprietà molecolari e potenziale patogeno. Sebbene l'inquadramento tassonomico sia ancora incerto, TTV appare condividere forti somiglianze con i virus della famiglia *Circoviridae*, tra cui si trovano agenti patogeni ampiamente diffusi negli animali ma nessun altro virus dell'uomo. Come i circovirus, TTV ha un diametro di circa 30-50 nm, è privo di pericapside e possiede un DNA monocatenario circolare di circa 3,8 kb, con polarità negativa. Il genoma comprende una porzione codificante con due, forse tre ORF e una regione di circa 1,2 kb che non é tradotta (UTR) ma é ricca di elementi regolatori. I prodotti delle ORF non sono ancora ben caratterizzati.

TTV presenta un grado di variabilità genetica inconsueto tra i virus a DNA. Tale eterogeneità é specialmente pronunciata nella regione codificante ed é massima nella zona centrale della ORF1 dove sono state identificati almeno 3 segmenti ipervariabili. La UTR é, invece, assai più conservata. L'analisi delle relazioni filogenetiche esistenti fra isolati diversi ha portato inizialmente alla classificazione di TTV in numerosi genotipi (fino a 16); tuttavia, la recente dimostrazione nell'uomo e negli animali di genomi TTV e TTV-simili altamente divergenti sembra suggerire che la classificazione del virus possa essere molto più complessa e debba tener conto dell'esistenza di più specie virali distinte anche se correlate. Particolarmente incerto appare l'inquadramento di ceppi a genoma più piccolo (2,9 kb) che sono stati descritti negli ultimi mesi e che vengono indicati come TLMV (TTV-like mini virus). Molti studi hanno preso in esame la distribuzione geografica dei genotipi di TTV. Alcuni, in particolare i genotipi 1 e 2, risultano molto diffusi mentre altri appaiono limitati a specifiche aree.

Le conoscenze sulla storia naturale di TTV sono scarse. In molti studi, una volta acquisita l'infezione, la maggior parte dei soggetti ha continuato a presentare il virus nel plasma per molti anni e forse indefinitamente, indicando che la cronicizzazione è un esito molto comune. I livelli di viremia oscillano fra  $10^3$  e  $10^8$  genomi virali per ml di plasma e in alcuni soggetti presentano ampie fluttuazioni mentre in altri rimangono

relativamente stabili. La possibilità che l'infezione possa risolversi spontaneamente appare incerta perché i casi di negativizzazione della viremia plasmatica descritti in alcuni studi possono essere il frutto della scarsa sensibilità del metodo analitico utilizzato. Le poche informazioni che possediamo sulle risposte immuni anti-TTV non sembrano prospettare una grande efficacia antivirale. In particolare, gli anticorpi non appaiono in grado di eradicare le infezioni in atto né di proteggere dalle superinfezioni. In effetti, le infezioni miste con molteplici genotipi sono un riscontro frequente, ponendo problemi diagnostici non indifferenti.

TTV è stata riscontrata in molti fluidi e distretti corporei ma non è ancora noto quali siano le sue sedi di replicazione. Le scarse evidenze disponibili, basate sulla ricerca degli intermedi di replicazione e su esperimenti di coltivazione in vitro, sembrano indicare che il virus può replicarsi nel fegato, nel midollo osseo e, dopo stimolazione della divisione cellulare con mitogeni policlonali, anche nei linfociti periferici.

Le prime indagini avevano segnalato prevalenze relativamente basse della viremia (1-10%). Lo sviluppo di tecniche di amplificazione genomica sempre più sensibili – cioè in grado di riconoscere una più vasta gamma di genotipi virali - ha però portato alla constatazione che TTV è invece enormemente più diffuso e ciò indipendentemente da origine etnica, età, condizioni socio-economiche e altre variabili. La prevalenza della viremia nella popolazione generale è spesso risultata maggiore dell'80% e in alcune indagini ha sfiorato il 100%. Non esistono ancora test sierologici attendibili che consentano l'identificazione di eventuali infezioni pregresse.

L'elevata prevalenza del genoma virale nei soggetti esposti al sangue nonché negli HBV e HCV positivi aveva portato a sottolineare l'importanza della via parenterale nella trasmissione dell'infezione. Questa via non appare tuttavia sufficiente a giustificare l'ampia diffusione dell'infezione nella popolazione sana. Il ritrovamento di sequenze virali in campioni di feci di soggetti viremici ha suggerito che TTV può essere trasmesso anche attraverso la via oro-fecale. La trasmissione intrauterina dell'infezione rappresenta un'altra importante modalità di contagio: recentemente è stato visto che più del 50% dei bambini nati a madri TTV positive acquisiscono il virus durante la vita intrauterina, indipendentemente dal livello di viremia materno al momento del parto. Il virus è presente anche nella saliva e nelle secrezioni nasofaringee, liquido spermatico, fluido vaginale e latte materno, indicando che sono probabili anche altre vie di trasmissione. Inoltre, sequenze filogeneticamente molto simili a TTV sono risultate comuni in varie specie di animali di allevamento oltre che in primati subumani, suggerendo che questi ospiti possano contribuire all'evoluzione genetica di TTV oltre che essere possibili fonti di trasmissione all'uomo.

Per quanto riguarda il possibile ruolo di TTV come agente di epatiti, si sta ripetendo quanto già accaduto con HGV. Infatti, gli studi più recenti tendono a escludere quasi del tutto un coinvolgimento di TTV come agente primario di patologie epatiche e anche come possibile fattore di aggravamento delle forme da HBV e HCV. Alcuni autori si sono anzi affrettati a proporre che TTV sia assolutamente apatogeno e rappresenti un semplice commensale. Finché non si saranno fatte indagini più complete, è però corretto considerarlo un virus orfano, in attesa di essere associato ad eventuali

patologie che possano magari svilupparsi solo in una minima quota dei soggetti infettati. Recenti osservazioni che TTV può circolare nell'ospite sotto forma di immunocomplessi e moltiplicarsi attivamente nei linfociti stimolati prospetta settori di indagine di notevole interesse potenziale, anche se l'estrema frequenza dell'infezione attiva nella popolazione può rendere difficile convalidare ogni associazione eziologica. Da segnalare che all'infezione è stato recentemente attribuito un significato prognostico negativo nella progressione dell'infezione HIV ma i dati in questo senso non sono univoci.

In ambito diagnostico, il riscontrare TTV nel sangue o in altri campioni ha scarsa utilità clinica. Più utile può essere determinare la carica virale che, in quanto espressione dei livelli replicativi del virus, probabilmente rappresenta il marcatore più idoneo per indagare il ruolo di TTV in determinate patologie. In ogni caso, le conoscenze su TTV sono in crescita tumultuosa e possono riservare interessanti evoluzioni anche nel settore delle patologie correlate.

## Bibliografia

- BENDINELLI, M., PISTELLO, M., FREER, G., VATTERONI, M.L., MAGGI, F. Viral hepatitis. In *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. N.R. Rose et al. (Ed.), Washington, American Society for Microbiology, 2001.
- BENDINELLI, M., PISTELLO, M., MAGGI, F., FORNAI, C., FREER, G., VATTERONI, M.L. Molecular properties, biology and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of man. *Clin Microbiol Rev* 2001,14, in press.
- BENDINELLI, M., PISTELLO, M., MAGGI, F., VATTERONI, M.L. Blood borne hepatitis viruses: hepatitis viruses B, C, D, and G, and TT virus. In *Clinical Virology Manual*, 3<sup>rd</sup> edition. S. Specter (Ed.). Washington, American Society for Microbiology, 2000.
- CHRISTENSEN, J.K., EUGEN-OLSEN, J., SORENSEN, M., ULLUM, H., GJEDDE, S.B., PEDERSEN, B.K., NIELSEN, J.O., KROGSGAARD, K. Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2000,181: 1796-1799.
- KIYOSAWA, K., TANAKA, E. GB virus C/Hepatitis G virus. *Intervirology* 1999,42: 185-195.
- MAGGI, F., FORNAI, C., MORRICA, A., CASULA, F., VATTERONI, M.L., MARCHI, S., CICCOROSSO, P., RIENTE, L., PISTELLO, M., BENDINELLI, M. High prevalence of TT virus viremia in Italian patients regardless of age, clinical diagnosis, and previous interferon treatment. *J Infect Dis* 1999,180: 838-842.
- MAGGI, F., FORNAI, C., ZACCARO, L., MORRICA, A., VATTERONI, M.L., ISOLA, P., MARCHI, S., RICCHIUTI, A., PISTELLO, M., BENDINELLI, M. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol*, in press.
- MORRICA, A., MAGGI, F., VATTERONI, M.L., FORNAI, C., PISTELLO, M., CICCOROSSO, P., GRASSI, E., GENNAZZANI, A., BENDINELLI, M. TT virus: evidence for transplacental transmission. *J Infect Dis* 2000,181: 803-804.
- PISTELLO, M., MORRICA, A., MAGGI, F., VATTERONI, M.L., FREER, G., FORNAI, C., CASULA, F., MARCHI, S., CICCOROSSO, P., ROVERO, P., BENDINELLI, M. TT virus levels in the plasma of infected individuals with different hepatic and extrahepatic pathologies. *J Med Virol*, in press.
- SIMONS, J.N., DESAI, S.M., MUSHAHWAR, I.K. The GB viruses. *Curr Top Microbiol* 2000,242: 341-375.
- TUCKER, T.J., SMUTS, H.E. GBV-C/HGV genotypes: proposed nomenclature for genotypes 1-5. *J Med Virol* 2000,62: 82-83.

TUCKER, T.J., SMUTS, H.E.M., EEDES, C., KNOBEL, G.D., EICKHAUS, P., ROBSON, S.C., KIRSCH, R.E. Evidence that the GBV-C/hepatitis G virus is primarily a lymphotropic virus. *J Med Virol* 2000,61: 52-58.

## **CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA E MOLECOLARE DEI VIRUS SEN: UNA FAMIGLIA DI VIRUS LONTANAMENTE CORRELATI ALL'ISOLATO ORIGINALE DI TTV**

Alessandra Sottini (a), Sonia Mattioli (a), Gianfranco Fiordalisi (a), Giovanni Mantero (a), Luisa Imberti (b), Daniele Moratto (a), and Daniele Primi (a)

(a) *DiaSorin, Centro Ricerche Biomolecolari, Via Calatafimi 1, 25100 Brescia, Italy*

(b) *Terzo Laboratorio Analisi and Institute of Chemistry, Spedali Civili, Brescia, Italy*

### **Riassunto**

Il clonaggio e sequenziamento del virus dell'epatite C e lo sviluppo di metodi sierologici e molecolari di identificazione del virus hanno diminuito drammaticamente l'incidenza dell'epatite post-trasfusionale. Ancora oggi, però, di circa il 10% dei casi di epatite post-trasfusionale e del 20% di quelli definiti "community-acquired" non si conosce l'esatta eziologia. Questo ha giustificato le ricerche, condotte negli anni recenti e mirate alla scoperta di eventuali nuovi agenti dell'epatite. Qui verrà descritto l'approccio da noi utilizzato per identificare nuovi virus che possono causare epatite.

- *Metodo:* Utilizzando primer altamente degenerati, costruiti a partire dalla sequenza originale del TTV, abbiamo identificato nel siero di un paziente HIV tossicodipendente, ma non in quelli di donatori di sangue, una sequenza che non apparteneva a nessun agente virale conosciuto. Tale sequenza è stata sequenziata e caratterizzata ed è stato identificato in questo modo il geneoma di un nuovo virus.
- *Risultati:* La nuova famiglia di virus, definita SENV, è composta da almeno 8 differenti membri. La trasmissione dei virus avviene principalmente per via ematica.

La relazione tra SENV e TTV deve essere ancora chiarita, ma l'alto grado di divergenza tra i due virus suggerisce che essi appartengano a specie virali differenti e che vi potranno essere problemi per la loro classificazione tassonomica.

- *Conclusione:* I risultati suggeriscono che esiste un gran numero di virus umani non ancora identificati. Il genoma del virus da noi scoperto è solo lontanamente correlato a quello del TTV: le omologie di sequenza tra i due virus si trovano però nella regione non tradotta e perciò gli studi fino ad ora eseguiti potrebbero essere non conclusivi e rendere difficile la comprensione della biologia delle infezioni. Per questa ragione i due virus, ma soprattutto i loro membri, devono essere identificati singolarmente con test altamente specifici per ogni sottotipo e analizzati singolarmente sia in termini di organizzazione genetica che di potenziale patogenico.

## Risultati e Discussione

Ancora oggi vi sono numerose condizioni patologiche ad eziologia sconosciuta che potrebbero essere causate da virus non ancora identificati. Malattie a sospetta eziologia virale includono molte patologie autoimmuni, alcune forme di anemia, e quelle epatiti (epatiti Non A Non E o epatiti "NANE") che non possono essere imputate ai virus già conosciuti.

L'identificazione prima del virus dell'epatite B (HBV) e poi di quello dell'epatite C (HCV), ha infatti sensibilmente ridotto i casi di epatite ma ancora oggi non si conosce l'esatta eziologia circa il 10% dei casi di epatite post-trasfusionale ed il 20% di quelli definiti "community-acquired" (1,2).

La ricerca di nuovi agenti responsabili di epatite ed il loro coinvolgimento nella patogenesi della malattia non ha fornito i risultati sperati. Nel 1995, nel siero di un paziente francese con epatite post-trasfusionale, non imputabile ai virus noti, è stato isolato un nuovo virus a RNA, definito GBV ed in seguito HGV (3,4); due anni più tardi, ricercatori giapponesi hanno identificato, sempre dal siero di un paziente con epatite post-trasfusionale ad eziologia ignota, un virus a DNA, chiamato TTV (5,6). Inizialmente si è ipotizzato che entrambi i virus potessero causare epatiti di origine sconosciuta, ma la loro alta percentuale nei soggetti sani ha escluso questa possibilità (7-13).

Durante un nostro studio mirato alla valutazione della prevalenza del TTV nella popolazione italiana e condotto utilizzando un set di primer altamente degenerati, capaci di amplificare numerosi varianti del TTV, abbiamo notato che l'amplificato ottenuto dal siero di un paziente tossicodipendente infettato da HIV migrava nel gel di agarosio in maniera differente rispetto a tutti gli altri prodotti di amplificazione. La sequenza nucleotidica del materiale genetico presente nell'amplificato aveva solo qualche nucleotide in comune con il TTV, ma era completamente differente dalle sequenze contenute in banca dati. La sequenza originale era composta da sole 600 basi, ma con diverse strategie all'inizio del novembre 1998, siamo riusciti a sequenziare quasi interamente il genoma di un nuovo virus che abbiamo definito virus SEN o SENV e che è solo remotamente correlato al TTV. Utilizzando primer degenerati, costruiti sulla base della sequenza originale del SENV, abbiamo in seguito identificato altri isolati virali con un grado più o meno elevato di identità nucleotidica con la sequenza del SENV originale. Ad oggi sono disponibili le sequenze di 8 isolati virali, che vengono definiti con le lettere dell'alfabeto: SENV-A, SENV-B, SENV-C, SENV-D, SENV-E, SENV-F, SENV-G e SENV-H. Sebbene tutti questi isolati siano stati inizialmente definiti come genotipi dello stesso virus, ora abbiamo ottenuto evidenze che dimostrano che essi appartengono a specie virali differenti e come tali devono essere considerati se si vogliono approntare efficaci test diagnostici.

Il genoma di tutti gli isolati di SENV ha una simile organizzazione molecolare, con due regioni conservate non tradotte (UTR) alle estremità 3' e 5' e la presenza di almeno 3 "open reading frames" (ORF). Poiché le UTR sono molto simili a quelle del TTV è possibile che i due virus abbiano avuto origine da un comune precursore ancestrale.



**C) Identità aminoacidica tra gli ORF 3 di SENV A, B, C, D, E, F, G, H e TTV**

	SENV A	SENV B	SENV C	SENV D	SENV E	SENV F	SENV G	SENV H
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
SENV AORF3	27.71	47.67	38.37	30.23	36.05	45.12	46.51	
SENV BORF3		36.14	31.33	27.71	28.92	30.49	37.35	
SENV CORF3			29.55	31.82	22.73	36.59	74.71	
SENV DORF3				25.00	64.77	28.05	34.48	
SENV EORF3					26.80	34.15	29.89	
SENV FORF3						26.83	29.89	
SENV GORF3							45.12	

La percentuale di identità tra gli ORF 1 dei differenti isolati va dal 39,7 che si trova per SENV-E e SENV-G, al 77,29 che si osserva per SENV-C e SENV-H. Questo significa che SENV-C e SENV-H sono i sottotipi più simili tra di loro. Anche SENV-F e SENV-D potrebbero costituire delle varianti di un comune isolato, visto che la loro percentuale di omologia arriva al 77,06. L'omologia di ORF 1 tra SENV-A e SENV-B è invece del 56,7%.

Il confronto tra i differenti ORF 2 e ORF 3 è più difficile, perché il loro allineamento, anche se eseguito con i migliori parametri del programma PALIGN di PC GENE, provoca numerose interruzioni: l'analisi della percentuale d'identità non riflette perciò la reale differenza tra le sequenze analizzate. Nonostante ciò, la percentuale di identità pare essere molto bassa, ad eccezione che per SENV-H e SENV-C e per SENV-F e SENV-D, che sembrano essere simili tra di loro.

E' importante notare che nonostante l'alto livello di divergenza osservato in ORF 1 e ORF 2 dei differenti SENV, tutte le proteine codificate sembrano essere ugualmente differenti da ORF 1 e ORF 2 della sequenza originale di TTV. La percentuale di identità, infatti varia dal 33,18 al 35,39 per ORF 1 e dal 22,84 al 35,63 per ORF 2. Questo significa che anche se originati da uno stesso precursore ancestrale, SENV e TTV si sono evoluti in maniera indipendente, dando origine a quelle che probabilmente devono essere considerate specie virali differenti. Questa possibilità è rafforzata dalla scoperta che la sequenza del SENV-E è molto simile a quella del SANBAM, un virus identificato di recente da Hijkata et al (14). Considerate le similitudini tra SANBAM e TTV, gli scopritori avevano proposto che il SANBAM rappresentasse una nuova specie virale o genus, piuttosto che un semplice genotipo del TTV. Allo stesso modo l'eterogeneo gruppo di SENV da noi identificato dovrebbe essere costituito da una nuova famiglia di virus, solo parzialmente correlati a TTV.

L'analisi delle sequenze del SENV ha svelato alcune altre caratteristiche dei nuovi virus. La bassa percentuale di identità osservata, ad esempio, tra le proteine codificate da ORF 1 e ORF 2 di SENV-G e SENV-E non permette di stabilire se i due virus appartengono a specie virali differenti o rappresentano due genotipi dello stesso virus.

Inoltre, il siero di coniglio prodotto immunizzando con la proteina ORF 2 ricombinante preparata sulla base della sequenza del SENV-C reagisce in un test ELISA con l'immunogeno, ma non con le proteine ricombinanti di SENV-A e SENV-D. Le

proteine ricombinanti dell'ORF 2 disponibili non inducono quindi reattività crociata tra di loro.

Tutte queste evidenze inducono ad affermare che l'unico chiaro denominatore condiviso da tutte le sequenze di SENV è la loro conservata distanza genetica con la sequenza originale del TTV.

Al fine di determinare se all'estrema eterogeneità strutturale dei SENV corrisponde una loro differente attività biologica od una diversa distribuzione in differenti categorie di pazienti, abbiamo sviluppato dei test, eseguiti mediante PCR, capaci di mettere in evidenza ciascuno dei differenti isolati. Il sistema di rivelazione della specificità del materiale amplificato prevede l'utilizzo di sonde specifiche per ciascun tipo di SENV e l'esecuzione del "DNA Immunoassay" (DEIA) da noi precedentemente sviluppato (15).

Inizialmente abbiamo analizzato l'eventuale presenza dei differenti SENV nel siero di 220 donatori sani. Il virus è stato identificato in una percentuale che va dallo 0% per il SENV-E and 2% per il SENV-C. L'unica eccezione è il SENV-B che è presente nel 13% dei soggetti testati e che quindi probabilmente è un virus ubiquitario, senza significato patogenetico. Simili risultati sono stati ottenuti da uno studio eseguito su pazienti affetti da patologie autoimmuni.

L'analisi di campioni prelevati da pazienti politrasfusi e tossicodipendenti infettati da HIV ha prodotto risultati completamente differenti in quanto un'alta percentuale di questi soggetti è risultata infetta. In particolare, il SENV-A è stato identificato nel 71% dei campioni appartenenti ai soggetti HIV tossicodipendenti (16). Il SENV perciò viene trasmesso per via ematica, ma poiché una percentuale di SENV-A così elevata è stata ritrovata solo in pazienti HIV<sup>+</sup> tossicodipendenti è possibile che la replicazione di questo sottotipo sia favorita dallo stato di immunodeficienza. In realtà anche il 26% di pazienti che hanno acquisito l'HIV per via sessuale risultano infettati dal SENV, perciò un'altra possibile via di contagio potrebbe essere quella sessuale (16).

Oltre al test che rivela la presenza di ciascun sottotipo di SENV, abbiamo preparato dei primer complementari a regioni conservate all'interno di ciascun sottotipo. Con questi primer è possibile amplificare simultaneamente in un'unica reazione di PCR, tutti i sottotipi. Con questo metodo, in collaborazione con il Prof. Harvey Alter dell'NIH, abbiamo analizzato, in uno studio in doppio cieco, un gruppo di sieri ottenuti da 13 pazienti che, in seguito ad intervento chirurgico per trapianto cardiaco, avevano subito delle trasfusioni di sangue e avevano sviluppato o meno epatite NANE (17). Come controllo sono stati studiati pazienti con le stesse caratteristiche, ma che non avevano ricevuto trasfusioni e non avevano sviluppato epatite. L'incidenza di infezione da SENV è risultata del 30% nei pazienti che avevano subito trasfusioni e del 3% in quelli che non erano stati trasfusi. In 11 dei 12 pazienti trapiantati che hanno sviluppato epatite NANE è stato trovato in virus SENV solo dopo la trasfusione di sangue risultato a sua volta infetto. L'analisi delle sequenze ha dimostrato che tutti i pazienti erano infettati o dal SENV-D o dal SENV-H e che due pazienti erano infettati da entrambi. L'identificazione del virus è avvenuta in corrispondenza ed a volte ha persino preceduto l'innalzamento delle transaminasi. Infine, lo stesso isolato di SENV-D o SENV-H è stato trovato sia nel donatore di sangue che nel paziente. L'estrema similitudine tra

isolato del paziente e isolato del donatore, insieme alla loro relativa distanza dalla sequenza canonica, dimostra inequivocabilmente il passaggio del virus attraverso il sangue. Complessivamente però, questi risultati confermano la possibilità che i sottotipi D ed H del SENV possano essere responsabili di epatite NANE post-trasfusionale.

In conclusione, abbiamo identificato una nuova categoria di virus che possono essere trasmessi attraverso il sangue. La loro relazione con il TTV è ancora tutta da dimostrare, ma il livello di diversità di tutti i sottotipi dalla sequenza canonica del TTV suggerisce che la famiglia di virus da noi identificata rappresenta una nuova specie virale. In ogni caso, comunque, si potranno avere dei problemi per quanto riguarda la classificazione e caratterizzazione tassonomica dei due differenti virus. Inoltre, è opportuno ricordare che voler a tutti i costi mettere in relazione il SENV ed il TTV può creare delle difficoltà nell'interpretazione dei risultati. Le omologie di sequenza tra i due virus si trovano, infatti, soprattutto nella regione non tradotta; cercare di associare SENV e TTV solo dopo aver eseguito analisi con test comuni ma appropriati perché identificano la regione condivisa tra i due, può rendere difficile la comprensione della biologia dell'infezioni. Bisognerebbe, al contrario, che i due gruppi di virus ed in particolare tutti i sottotipi o varianti, vengano identificati separatamente con test molto specifici ed analizzati singolarmente sia in termini di organizzazione genetica che di potenziale patogenetico. Solo in questo modo si può evitare di generare confusione e si può ottenere l'esatta stima della prevalenza del TTV e delle differenti varianti di SENV nell'uomo, nonché il vero ruolo dei due virus come agenti di malattie ad eziologia ancora sconosciuta.

### Bibliografia

1. ALTER, HJ, BRADLEY, DW. Non-A, non-B hepatitis unrelated to hepatitis C virus (non-ABC). *Semin Liver Dis* 1995,15: 110-120.
2. ALTER, MJ, MARGOLIS, HS, KRAWCZYNSKI, K, JUDSON, FN, MARES, A, ALEXANDER, WJ, HU, PY, ET AL. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *New Engl J Med* 1992,327: 1899-1905.
3. SIMON, JN, LEARY, PJ, DAWSON, GJ, ET AL. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995,1: 564-569.
4. LINNEN, J, WAGES, J, ZHANG-KECK, ZY, ET AL. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion transmissible agent. *Science* 1996,271: 505-508.
5. NISHIZAWA, T, OKAMOTO, H, KONISHI, K, YOSHIZAWA, H, MIYAKAWA, Y, MAYUMI, M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 241: 92-97.
6. OKAMOTO, H, NISHIZAWA, T, KATO, N, UKIDA, M, IKEDA, H, IIZUKA, H, MIYAKAWA, Y, MAYUMI, M. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res* 1998,10: 1-16.
7. COLOMBATTO, P, BRUNETTO, MR, KANSOPON, J, OLIVERI, F, MAINA, A, ARAGON, U, BORTOLI, ML, SCATENA, F, BAICCHI, U, HOUGHTON, M, BONINO, F, WEINER, AJ. High prevalence of G1 and G2 TT-virus infection in subjects with high and low blood exposure risk: identification of G4 isolates in Italy. *J Hepatol* 1999,1: 990-996.

8. DESAI, SM, MUEHROFF, AS, LEARY, TP, ERKER, JC, SIMONS, JN, CHALMERS, ML, BIRKENMEYER, LG, PILOT-HANDA, A, DICKSTEIN, B, YOUNG, NS, BROWN, KE. Prevalence of the newly described human circovirus, TTV, in United States blood donors. *Transfusion* 2000, 40:245-251.
9. SIMMONDS, P, DAVIDSON, F, LYCETT, C, PRESCOTT, LE, MACDONALD, DM, ELLENDER, J, YAP, PL, LUDLAM, CA, HAYDON, GH, GILLON, J, JARVIS, LM. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 1998,352: 191-195.
10. MATIAS, TJ, MUSHAHWAR, IK. Prevalence of TT virus infection in US blood donors and populations at risk for acquiring parenterally transmitted viruses. *J Infect Dis* 1999,179: 1242-1244.
11. COSSART, Y. TTV a common virus, but pathogenic? *Lancet* 1999,352: 164.
12. IMAWARI, M. TT virus (TTV) is unlikely to cause chronic liver damage. *J Gastroenterol* 1999,34: 292-293.
13. MATSUMOTO, A, YEO, AE, SHIH, JW, TANAKA, E, KIYOSAWA, K, ALTER, HJ. Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease. *Hepatology* 1999,30: 283-288.
14. HIJIKATA, M, TAKAHASHI, K, MISHIRO, S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 1999,260: 17-22.
15. MANTERO, G, ZONARO, A, BERTOLO, P, ALBERTINI, A, PRIMI, D. DNA enzyme immunoassay (DEIA): a general method for detecting polymerase chain reaction products based on anti-DNA antibody. *Clin Chem* 1991,37: 422-429.
16. PIROVANO, S, SOTTINI, A, BELLINZONI, M, MATTEELLI, A, ALBERINI, A, PRIMI, D, IMBERTI, L. High prevalence of subtype A of SENV, a novel DNA virus, in intravenous drug user HIV-infected patients (sottomesso a pubblicazione).
17. UMEMURA, T, YEO, AET, WANG, RY, SHIH, A-K, DONAHUE, P, PRIMI, D, ALTER, AJ. Trasfusione-associated SEN Virus infection and its relationship to liver disease (sottomesso a pubblicazione).

## **I MARCATORI DI INFEZIONE, REPLICAZIONE E MALATTIA**

Moderatori: Maria Rapicetta, Ferruccio Bonino

## **METODI DI RILEVAMENTO DI HCV-RNA MEDIANTE PCR**

Giuseppe Colucci

*Roche Molecular Systems, Scientific Affairs, Rotkreutz, Svizzera*

La progressiva semplificazione ed automazione della PCR ne hanno favorito l'introduzione nel laboratorio clinico dove essa è divenuta una metodica di riferimento per la determinazione qualitativa e quantitativa di agenti patogeni (1,2).

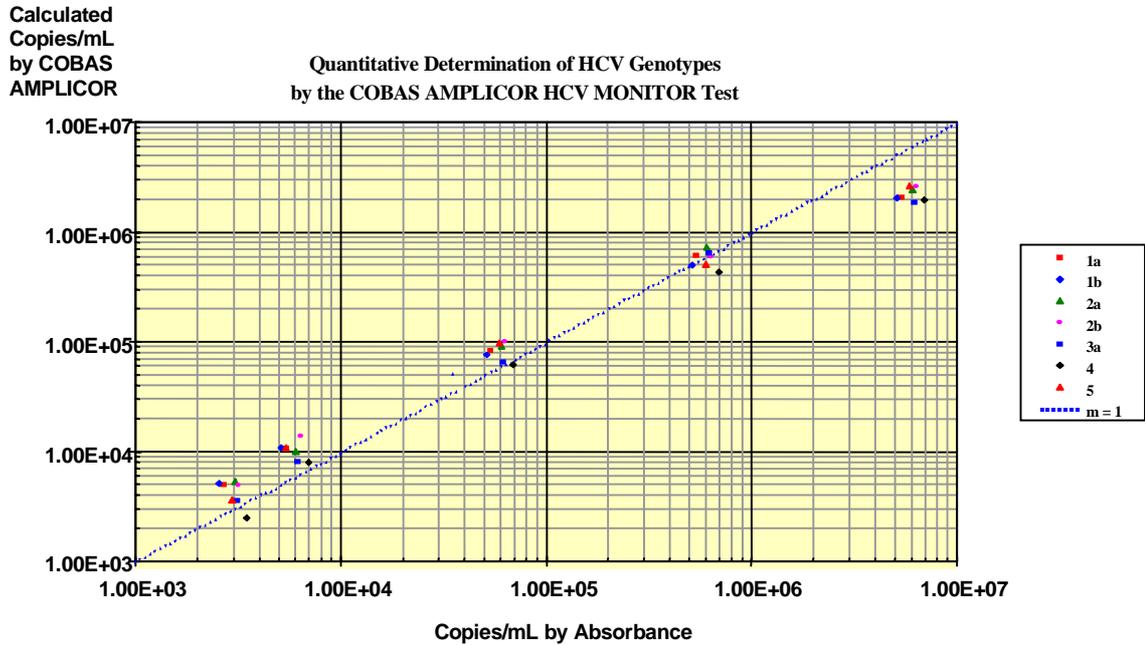
L'infezione da HCV è uno degli esempi più significativi di come la PCR possa fungere da strumento di ricerca di base, per la definizione dell'organizzazione genomica e biologica del virus, e da mezzo diagnostico/prognostico per indicare l'attività e l'evoluitività dell'infezione, così supplendo alla mancanza di metodiche di isolamento virale e alla scarsa informatività dei tests serologici (3-5).

A seguito della scoperta di HCV nel 1989, la PCR è stata impiegata per clonare ed esprimere prodotti virali, confermare la presenza di un'infezione attiva in sieropositivi e definire l'epidemiologia dell'infezione. La costante evoluzione tecnica della metodica ha consentito la messa a punto di tests sempre più affidabili ormai comunemente utilizzati nella pratica clinica. La selezione di primers universali e genotipo-specifici, il controllo dei falsi positivi e negativi, dovuti, rispettivamente, a contaminazioni o inibizioni enzimatiche, sono stati i passaggi principali attraverso cui la PCR ha raggiunto la necessaria sensibilità e specificità (1). In particolare, la prevenzione di amplificazioni non specifiche dovute a contaminazioni crociate da parte di prodotti di amplificazioni precedenti (carry over), è stata ottenuta mediante l'impiego di un'enzima, uracile-N-glicosilasi (Amperase®), in grado di degradare ampliconi che contengono dUTP (6). Parallelamente, l'introduzione di un controllo interno, costituito da una molecola di sintesi analoga a quella in esame, permette di valutare l'efficienza della reazione ed identificare possibili inibitori delle polimerasi, a volte responsabili di risultati falsi negativi (7). Un altro fattore importante, che ha sensibilmente migliorato l'efficacia della PCR per HCV-RNA, è stato lo sviluppo della polimerasi isolata dal *Thermus thermophilus* (Tth) che esegue la retrotrascrizione e l'amplificazione di RNA in una singola reazione (8). La maggior efficienza della Tth ha anche consentito di evitare le due amplificazioni sequenziali dei primi saggi "nested", spesso causa di contaminazioni difficilmente controllabili per il grande numero di ampliconi prodotti (9).

L'affidabilità delle metodiche e la precisione dei laboratori che eseguono la determinazione di HCV-RNA, risultata carente nei primi studi di controllo di qualità, è così notevolmente migliorata anche grazie allo sviluppo di metodiche basate su configurazioni tipo ELISA parzialmente eseguibili in automazione (10,11). Questi tests, denominati Amplicor® HCV, prevedono infatti l'amplificazione della regione 5' non tradotta con primers biotinilati che, marcando i prodotti di amplificazione, li rendono facilmente rilevabili mediante legame con avidina dopo cattura su fase solida attraverso ibridizzazione con sonde specifiche (12,13). L'attuale disponibilità di questi tests su uno strumento dedicato, Cobas Amplicor™, che esegue in automatico le fasi di

amplificazione e rilevamento, ne ha aumentato l'utilizzo sia per la versione qualitativa, Cobas Amplicor HCV™, che per quella quantitativa, Cobas Amplicor HCV Monitor™ (14-16). La prima, con una sensibilità di 100 copie/ml (50UI/ml), viene comunemente impiegata per confermare un'iniziale positività anticorpale e per identificare un'infezione in atto in soggetti immunodepressi o in neonati da madri sieropositive. Amplicor HCV è stato recentemente utilizzato anche nell'analisi dei prodotti emoderivati e delle donazioni di sangue per offrire un ulteriore livello di sicurezza nell'escludere la presenza di agenti infettivi. Infatti, il lungo intervallo di tempo che precede la sieroconversione rende possibile la trasfusione di plasma o cellule infette da donatori che non hanno ancora sviluppato anticorpi specifici in concentrazioni rilevabili con i test convenzionali. Per garantire l'uniformità dei risultati e la loro indipendenza dalle metodiche utilizzate, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha sviluppato uno standard di riferimento per il genoma di HCV (HCV-RNA), espresso in unità internazionali (UI) per millilitro che serve anche a verificare la sensibilità minima richiesta di 100 UI/ml (17). Utilizzando una metodica di preparazione del campione che concentra per ultracentrifugazione le particelle virali (Cobas Ampliscreen™ HCV), e pools da 24 campioni allestiti in automatico (Hamilton ATPlus2) è stato possibile raggiungere una sensibilità di 25-50 UI/ml ed una specificità di 99,9% (18). In una valutazione multicentrica in corso negli Stati Uniti presso 13 centri diversi affiliati all'American Red Cross e all'American Association of Blood Banks, Cobas Ampliscreen™ HCV ha permesso di identificare 6 campioni positivi per HCV-RNA e anti-HCV e 13 campioni positivi per HCV-RNA ma negativi per anti-HCV, in una fase pre-sieroconversione, per un'incidenza di 1 su 467.000 e 1 su 215.000 rispettivamente. I risultati ottenuti fino ad ora, che si riferiscono a circa 3.000.000 di donazioni analizzate hanno mostrato una specificità del 99,9%, un'incidenza di falsi positivi del 0,1% ed una frequenza di risultati nulli, dovuti a problemi tecnici, del 2,8%.

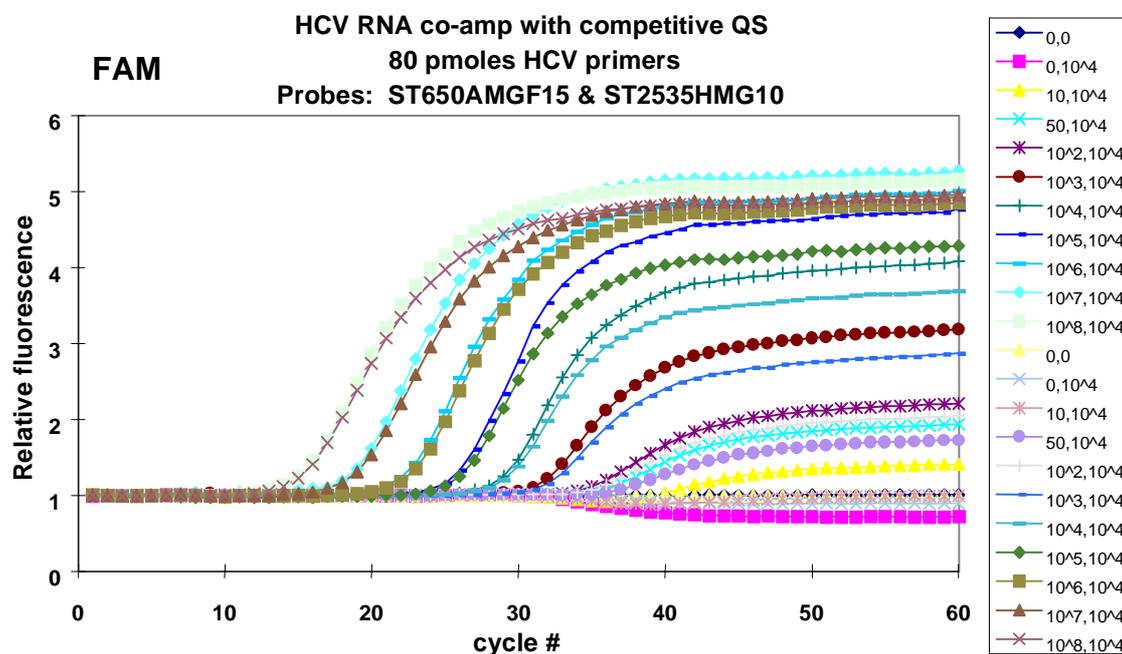
Nella versione quantitativa, Cobas Amplicor HCV Monitor™, che ha un range dinamico espresso in UI/ml compreso tra 600 e 850.000 (circa  $10^3$ - $10^6$  copie/ml) (Figura 1), si è dimostrato utile nel seguire l'andamento della carica virale in soggetti con epatite cronica. Studi retrospettivi e prospettici, eseguiti su pazienti in terapia antivirale con interferone da solo o in combinazione con ribavirina, hanno indicato il valore predittivo della viremia nell'indicare la probabilità di risposta al trattamento sia prima che durante le prime settimane di terapia. Livelli di  $10^5$  copie/ml (circa 500.000 UI/ml) rappresentano il limite che separa soggetti con prognosi terapeutica positiva o negativa e costituisce un parametro di riferimento per la selezione del regime più opportuno (19-24). Analogamente, la cinetica del HCV-RNA osservata durante le prime 4 o 8 settimane dall'inizio della terapia si associa significativamente alla risposta a lungo termine: mentre il valore predittivo positivo di una riduzione della viremia di almeno 1 logaritmo è di circa il 60%, perchè non è possibile prevedere eventuali riacutizzazioni, quello negativo, relativo ad una mancata analoga diminuzione o a valori persistentemente superiori a  $10^5$  copie/ml supera il 98% (25-33).



**Figura 1** - Cobas Amplicor HCV Monitor. Linearità e range dinamico per diversi genotipi virali.

Questi dati suggeriscono che si possano identificare i pazienti non responsivi in una fase estremamente precoce così da modificarne tempestivamente il regime terapeutico, limitando il più possibile gli effetti collaterali del trattamento ed i costi di cura.

L'impiego e l'utilità clinica di questi tests quantitativi saranno ulteriormente incrementati dall'introduzione di metodiche basate sulla PCR cinetica o Taqman™ che permette di quantificare con precisione sia alte che basse cariche virali comprese tra  $50$  a  $10^8$  copies/ml (34,35). Il vantaggio principale offerto da questo approccio risiede non solo nell'aumentata efficienza e precisione di quantificazione, ma anche nella velocità di esecuzione, in quanto il segnale di lettura viene prodotto durante la fase di amplificazione dal clivaggio di una sonda che produce l'emissione esponenziale della fluorescenza. Il ciclo di amplificazione a cui corrisponde un segnale superiore al valore soglia si correla con la quantità di HCV-RNA contenuto nel campione in esame, così che in un numero medio di 50 cicli è possibile discriminare in un ambito di circa 6-8 logaritmi (Cobas Taqman™) (Figura 2).



**Figura 2** - Cobas Taqman HCV RNA Monitor. Linearità e range dinamico.

L'imminente completa automazione della PCR, grazie all'introduzione di un'apparecchiatura dedicata alla preparazione del campione, Cobas AmpliPrep™, renderà l'identificazione e quantificazione del genoma di HCV sempre più accurata ed affidabile aumentandone l'utilità sia nella ricerca che nella pratica clinica.

### Bibliografia

1. WHITE, T. The future of PCR technology: diversification of technologies and applications. *Trends Biotechnol* 1996,14: 478-83.
2. WHITE, T. J., MADEJ, R., PERSHING, D. H.. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv Clin Chem* 1992,29: 161-196.
3. ALTER, H. J. To C or not to C: these are the questions. *Blood* 1995,85: 1681-1695.
4. GRETCH D. R.. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997,26: 43S-47S.
5. CONRY-CANTILENA C. Hepatitis C virus diagnostics: technology, clinical applications and impacts. *Trends Biotechnol* 1997,15: 71-76.
6. LONGO MC ET AL. The use of Uracil DNA Glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990,93: 125-128.
7. ROSENSTRAUS M., WANG Z., CHANG S. Y., DEBONEVILLE D., SPADORO S. P. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *J Clin Microbiol* 1997,36: 191-197.
8. MYERS T. W., GELFAND D.H. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1991,30: 7661-7666.
9. RYS, P. N., PERSHING, D. H. Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol* 1993,31: 2356-2360.

10. ZAAIJER, H.J., CUYPERS, H.T., REESINK, H.W. Reliability of HCV PCR results. *Lancet* 1993,341: 722-724.
11. DAMEN, M., CUYPERS, H. T. M., ZAAIJER, H. W., REESINK, H. W., SCHAASBERG, W. P., GERLICH, W. H., NIESTERS, H. G. M., LELIE, P. N. International collaborative study on the second EUROHEP HCV-RNA reference panel. *J Virol Meth* 1996,58: 175-185.
12. YOUNG K. K. Y., RESNICK R.M., MYERS T.W. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol* 1993,31: 882-886.
13. YOUNG KKY, RESNICK RM AND MYERS TW. Detection of Hepatitis C Virus RNA by a Combined Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay. *J Clin Microbiol* 1993,31: 882-886.
14. GERKEN, G., PONTISSO, P., ROGGENDORF, M., RUMI, M.G., SIMMONDS, P., TREPO, C., ZEUZEM, S., COLUCCI G. Clinical evaluation of a single reaction, diagnostic PCR assay for the detection of hepatitis C virus (HCV) RNA. *J Hepatol* 1996,24: 33-37.
15. JUNGKIND, D., DIRIENZO, S., BEAVIS, K. G., SILVERMAN, N. S. Evaluation of automated COBAS AMPLICOR PCR system for detection of several infectious agents and its impact on laboratory management. *J Clin Microbiol* 1996,34: 2778-2783.
16. GERKEN, G., ROTHAAAR, T., RUMI, M. G., SOFFREDINI, R., TRIPPLER, M., BLUNK, M. J., BUTCHER, A., SOVIERO, S., COLUCCI, G. Performance of the Cobas Amplicor HCV Monitor tes, version 2.0, an automated reverse transcription PCR quantitative system for hepatitis C virus load determination. *J Clin Microbiol* 2000,38: 2210-2214.
17. SALDANHA, J, HEATH, A, LELIE, N, PISANI, G, NUBLING, M, YU, M. Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV international standard. The Collaborative Study Group. *Vox Sang* 2000,78: 217-24.
18. GALLARDA, J., DRAGON, E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges. *Mol Diagn* 2000,5: 11-22.
19. TEUBER, G.G. ET AL. Long-term follow-up of patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha treatment. *Digestion* 1996,421: 1-8.
20. GERKEN, G. ET AL. Quantification and genotyping of serum HCV-RNA in patients with chronic hepatitis C undergoing interferon treatment. *Arch Virol* 1997,142: 459-464.
21. TRABAUD, M. A., BAILLY, F., SI-AHMED, S. N., CHEVALLIER, P., SEPETJAN, M., COLUCCI, G., TREPO, C. Comparison of HCV RNA assays for the detection and quantification of hepatitis C virus RNA levels in serum of patients with chronic hepatitis C treated with interferon. *J Med Virol* 1997,52: 105-112.
22. SOFFREDINI, R., RUMI, M. G., DEL NINNO, E., PARRAVICINI, M. L., RUSSO, A., COLOMBO, M. Serum levels of hepatitis C virus RNA predict non-response to interferon therapy: comparison of two commercial assays. *J Viral Hepatitis* 1999,6: 63-70.
23. PAYEN, J. L. ET AL. Better efficacy of a 12 month interferon alfa-2b retreatment in patients with chronic hepatitis C relapsing after a 6-months treatment: a multicenter, controlled, randomized trial. *Hepatology* 1998,28: 1680-1686.
24. KNOLLE, P.A., ET AL. Viral and host factors in the prediction of response to interferon alpha therapy in chronic hepatitis C after long term follow-up. *J Viral Hepatitis* 1998,5: 399-406.
25. AMPURDANES, S, OLMEDO, E, MALUENDA, MD, FORNS, X, LOPEZ-LABRADOR, FX, COSTA, J, SANCHEZ-TAPIAS, JM ET AL. Permanent response to alpha-interferon therapy in chronic hepatitis C is preceded by rapid clearance of HCV-RNA from serum. *J Hepatology* 1996,25: 827-832.
26. KARINO, Y., TOYOTA, M. SUGAWARA, K. HIGASHINO, T. SATO, T. OHMURA, T. SUGA, Y. ET AL. Early loss of serum hepatitis C virus RNA can predict a sustained response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1997,92: 61-65.
27. FLICHTMAN, D., COLOMBATTO, P., RANDONE, A., BALDI, M., BELLATI, G., NEGRO, F., OLIVERI, F. ET AL. Quantitative detection of hepatitis C virus RNA in the serum of patients with chronic hepatitis C treated with interferon: a pilot study. *Clin Diagnostic Virol* 1997,8: 63-70.

28. ICHIJO, T. ET AL. Quantitative measurement of HCV RNA in the serum: a comparison of three assays based on different principles. *J Gastroenterol Hepatol* 1997,12: 500-506.
29. SHIRATORI, Y., KATO, N., YOKOSUKA, O., HASHIMOTO, E., HAYASHI, N., NAKAMURA, A., ASADA, M. ET AL. Quantitative assays for hepatitis C virus in serum as predictor of the long-term response to interferon. *J Hepatol* 1997,27: 437-444.
30. YAMAKAWA, Y., SATA, M., SUZUKI, H, TANAKA, K, TANAKA, E, NOGUCHI, S, ONO, K. ET AL. Monitoring of serum levels of HCV RNA in early phase of IFN therapy; as a predictive marker of subsequent response. *Hepato-Gastroenterology* 1998,45: 133-136.
31. ZEUZEM, S., LEE, J.H., FRANKE, A., RUSTER, B., PRUMMER, O., HERRMANN, G., ROTH, W.K. Quantification of the initial decline of serum hepatitis C virus RNA and response to interferon alfa. *Hepatology* 1998,27: 1149-1156.
32. ZEUZEM, S. Clinical implications of hepatitis C viral kinetics. *J Hepatology* 1999,31 (S1): 61-64.
33. CASTRO, F.J. ET AL. Utility of early testing for HCV viremia as predictive factor for sustained response during interferon or interferon plus ribavirin treatment. *J Hepatology* 2000,32: 843-849.
34. HOLLAND, P., ET AL. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991,88: 7276-7280.
35. KAWAI, S, YOKOSUKA, O, KANDA, T, IMAZEKI, F, MARU, Y, SAISHO, H. Quantification of hepatitis C virus by TaqMan PCR: comparison with HCV Amplicor Monitor assay. *J Med Virol* 1999,58: 121-6.

## **SINGLE TESTING OF HIV-1 AND HCV GENOMES BY A TRANSCRIPTION MEDIATED AMPLIFICATION METHOD**

Pierre Moncharmont

*Etablissement Francais du Sang Lyon, France*

### **Background**

Nucleic Acid Testing (NAT) of HIV and Hepatitis C virus (HCV) will reduce the preseroconversion window period on about 11 days for HIV and 31 days for HCV and improve blood products safety. In the recent past, because technology was not available, NAT for HIV and/or HCV RNA on all blood donations was performed on pools only. A new technology based on «Transcription Mediated Amplification®» (TMA) was developed by the Gen-Probe Company (San Diego, U.S.A.). The test is a Multiplex and detected both HIV1 and HCV RNAs in plasma. In aim to establish its efficiency and practicability, we have evaluated this assay and screened blood donations in routine.

### **Study Design**

*A - Pre-analytical phase* - Plasma samples were collected on tube with a gel barrier and EDTA as anticoagulant (BD Vacutainer®, Plasma Preparation Tube, 5 ml draw, made in Plymouth, U.K.). Six hours after donor collection, whole blood samples are centrifuged. An extension of time up to 6 hours is acceptable. Routinely, samples are immediately treated. In few cases (e.g. week ends), the samples are centrifuged and stored at +4°C (range +2°C +8°C) before processing. A good separation between plasma and cellular components is obtained with the BD PPT™ tube and makes the storage possible.

*B - Analytical phase* - The Multiplex® TMA HIV-1/HCV RNA test (Gen-Probe, San Diego, U.S.A., Chiron Corporation Blood Testing, U.S.A.) which simultaneously detected HIV-1 RNA and HCV RNA was used for single unit testing. This test is based on T.M.A. The process is divided in three steps. First step is the target capture. After lysis of the viruses, nucleic acid of HIV-1 and/or HCV are separated from the plasma with the «Target Capture System®» (T.C.S.). Briefly, magnetic microparticles coated with oligo nucleotides allow specific RNAs capture of the two viruses. The target capture reagent also contains an internal control (IC) calibrated to 500 copies per reaction. This IC is processed and validated each assay. After hybridization, the reaction tubes are introduced in a magnetic rack and two wash steps are done to purify the microparticles and the bound RNAs from all other plasma components. Amplification represents the second step. Two enzymes are used, a Reverse transcriptase and a RNA polymerase. The amplification is isothermal and a continuous process. Over one billion

copies of RNA is obtained from viral RNA after amplification. The step three, detection, is a chemiluminescent reaction based on two technologies. The «Hybridization Protection Assay» (HPA) is a chemical inactivation of label on unhybridized probes and the «Dual Kinetic Assay» (DKA) is an automated one-step detection differentiating IC signal from the viral analyte signal. A luminometer reads the signals in each tube and a software gives the result of the assay. All tests are performed on a high throughput semi automated system which included a sample dispenser (Tecan Genesis, Tecan, Switzerland), the T.C.S., shakers, incubators and a luminometer. The software of the luminometer is connected to the laboratory software.

Three parameters have been tested: sensitivity, fidelity (repeatability and reproducibility) and specificity.

Sensitivity of the method was evaluated with four panels from the C.L.B. (Amsterdam, NL), Pelicheck HIV-1 RNA genotype B (ref. S 2091, S 2092), Pelicheck HCV RNA genotype 3 (ref. S 2089, S 2090), Pelicheck HCV RNA genotype 1 (ref. S 2087, S 2088), Pelicheck HCV RNA 1997 genotype 1 (ref. S 2050, S 2051) and one from AcroMetrix (Berkeley, CA, U.S.A.), the Nucleic Acid Panel HCV RNA.

For fidelity, a multimarker run control was used (Pelispy Multimarker, CLB, NL). It was calibrated at 100 UI/ml of HCV RNA genotype 1 and 380 genome equivalent/ml (geq/ml) of HIV-1 RNA. Intra and between assay run coefficients of variation (C.V.) are calculated.

Specificity was established during an initial study and after routine testing. An initial reactive (IR) sample was retested in duplicate with the Multiplex® TMA HIV-1/HCV RNA. Repeat reactive (RR) samples were evaluated with the discriminatory TMA HIV-1 RNA and HCV RNA assays. The discriminatory assays have the same protocol as the Multiplex but at the detection's step, probes are different, one for HIV-1 or one for HCV RNAs.

In the same way, antibodies to HIV-1/2 and HCV were screened with the Vironostika HIV Uniform II Ag/Ab (Organon Teknika) and Monolisa Anti-HCV Plus (Biorad) respectively.

## Results

The results of the sensitivity are shown on Table I.

**Table 1** – Sensitivity of the assays : results obtained on the five panels

Reagent	Panels				
	Pelichek HIV-1 RNA gen.B	Pelichek HCV RNA gen.3	Pelichek HCV RNA 1997 gen.1	Pelichek HCV RNA gen.1	Nucleic acid panel HCV RNA
Multiplex TMA HIV-1/HCV RNA	8 geq/ml*	37.0 IU/ml**	2.0 IU/ml	3.0 IU/ml	50.0 IU/ml
TMA HIV-1 RNA discriminatory assay	8 geq/ml	/	/	/	/
TMA HCV RNA discriminatory assay	/	11.0 IU/ml	2.0 IU/ml	1.0 IU/ml	50.0 IU/ml

\* Genome equivalent = geq

\*\* International unit from the HCV RNA W.H.O. Standard.

For HIV-1, a concentration of 8 HIV-1 RNA geq/ml is detected by the Multiplex and the discriminatory assays. On the HCV RNA panels, better results are observed with the discriminatory assay. Furthermore, the sensitivity of the Multiplex and discriminatory assays is better on HCV RNA genotype 1 than 3.

For fidelity, the intra assay run C.V. (repeatability) are 2, 3 and 6% on ten assays per run, three days. Between assay run C.V. (reproducibility) is 8% on 30 assays, one per day.

From 12<sup>th</sup> May 1999 to 31<sup>st</sup> July 2000, 83,006 blood donations are tested. Autologous blood donations are excluded. Two hundred and thirty-three samples are IR (0.32%). After testing in duplicate, 8 samples (0.0096%) are RR. On these samples, two are positive for HIV-1 RNA and six for HCV RNA on discriminatory assay. All these samples are positive for antibodies to HIV-1 or HCV respectively. One donor HIV-1 RNA positive is P24 antigen positive.

A follow-up sample was collected in five blood donors. Same results are obtained with TMA assays and in serology. No false positive result is detected. So, the specificity obtained with the Multiplex® TMA HIV-1/HCV RNA assay is excellent. Among the 83,006 donations, no HIV-1 and/or HCV RNA positive but antibody negative sample is observed.

In practice, 1,114 runs are processed. Each run has a main of 75 samples. Forty-five runs are invalid (4.04%). IC failure is observed in 577 samples (0.70%). The prevalence of these events on different periods is shown on Table II.

**Table 2** – *Number of treated samples and observed events on different periods during single testing on all blood donations*

PERIOD	from 12.05.1999 to 31.12.1999	from 01.01.2000 to 31.03.2000	from 01.04.2000 to 31.07.2000	Total
Number of samples tested	29,593	24,594	28,819	83,006
Number of runs	373	347	394	1,114
Number of invalid runs	11 (2.9)*	23 (6.6)	11 (2.8)	45 (4.04)
Number of invalid samples	165 (0.56)	209 (0.85)	203 (0.70)	577 (0.70)

\* percentage

Origins of invalid results have been partially explained and resolved. Invalid runs are observed when a new technician begins to work in routine. On a long time period, the number of invalid run decreases. IC failure is due to viscosity. Thus, IC must be left 30 minutes at room temperature (22°C) before use. Furthermore, a survey of the Tecan Genesis is necessary to obtain a good dispense of samples and reagents particularly IC.

One technician can manage 300 assays per day (3 runs, 8 hours). Usually, two technicians work in the laboratory from 8.30 a.m until 7.15 p.m. The process does not interfere with the other labs' activities (serology and immunohaematology). The maximum number of samples daily treated with one semi-automated system is 800. Blood products release, particularly platelets, is not delayed by NAT. Efficiency of TMA technology in practice is very good.

## Conclusion

Today, single donation testing for HIV-1 and HCV RNAs is possible in blood banks. The screening test MULTIPLEX<sup>®</sup> TMA HIV-1/HCV RNA has a very good sensitivity and fidelity and an excellent specificity. Technical problems are partially explained and resolved.

In the future, a fully automated system is in development (TIGRIS<sup>®</sup>). The number of samples treated per day will significantly increase (1,000 samples per 12 hours). The number of invalid runs and invalid assays will probably decrease. Lastly, a test including HBV DNA screening is in development. This «TRIPLEX» will also improve blood safety.

## **IMMUNOASSAY SYSTEMS FOR CIRCULATING HCV CORE PROTEIN IN THE DETECTION AND DIAGNOSIS OF HCV INFECTION**

Stephen R. Lee (a), John McHutchison (b), Tse-Ling Fong (c), Patrick Niven (a), Jon Peterson (a), David Baggett (a), George Green (a)

(a) *Ortho Clinical Diagnostics, Raritan , NJ, USA*

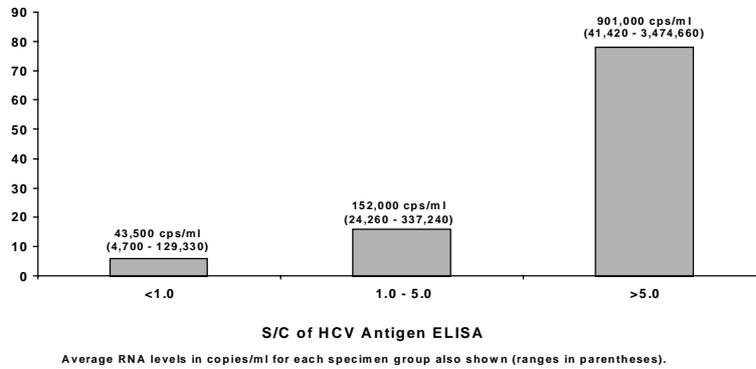
(b) *Scripps Clinic & Research Foundation, La Jolla, CA, USA*

(c) *Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA, USA*

Recent studies have shown that in individuals infected with hepatitis C virus (HCV), the presence of circulating HCV RNA is invariably accompanied by the presence of HCV core protein (1,2). Moreover, both HCV RNA and core antigen become detectable approximately 50 days before the appearance of anti-HCV in the early phase of infection (3). As a result, blood donations given during the antibody negative “window phase”, may be identified by testing for either HCV core antigen or HCV RNA. Although, nucleic acid testing (NAT) has so far provided greater analytical sensitivity for identification of viremia, HCV antigen testing is considered a suitable alternative because of its simplicity, speed and similar clinical sensitivity for the identification of potentially infectious units. Moreover, HCV antigen screening ELISAs can be used to test individual blood donations and therefore offer significant operational advantages compared to NAT, which has so far been confined to testing pooled blood donations (4).

Studies of chronically infected individuals have shown that HCV core antigen can also be identified in seropositive individuals by pre-treating the specimen prior to testing, in order to dissociate antigen bound as immune complex (5). These studies have shown that the amount of circulating HCV antigen correlates with levels of viremia determined by RNA testing. These results suggest that an immunoassay for HCV antigen may have utility for diagnosis of viremia in infected individuals as well as in monitoring patients' response to therapy.

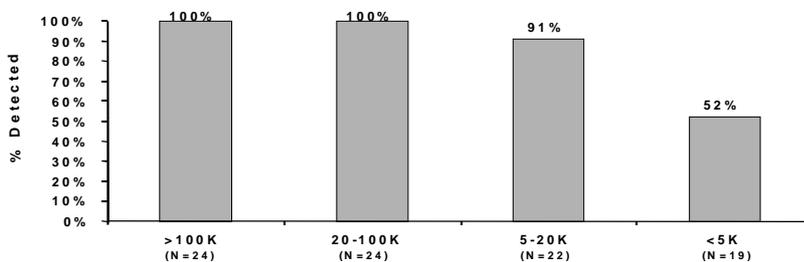
A microplate ELISA for HCV antigen has now been approved in many European countries for routine screening of blood donations. More recently, prototype “second generation” assays have been developed with greater analytical sensitivity for viral detection and which can be used for diagnosis and monitoring in seropositive individuals. We have studied the performance of these assays in detecting early (seronegative) infection as well as in monitoring patients on various courses of HCV therapy. A total of 128 specimens from plasma donors in the early, seronegative phase of infection were tested for HCV RNA and for HCV core antigen by the current screening ELISA. One hundred and twenty (94%) contained HCV antigen detectable by ELISA and 78% had signal:cutoff (S/C ratios >5.0 (Figure 1).



**Figure 1** - Detection of HCV core antigen in the early antibody negative phase of infection.

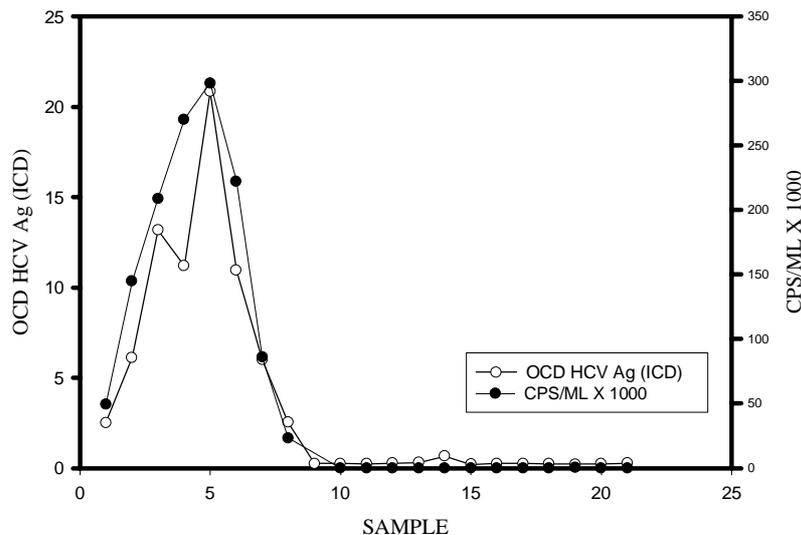
The average viral load among the 120 antigen positive specimens was 776,000 copies/ml (24,000-3.5.10<sup>6</sup>). The average viral load for the 8 antigen negative specimens was 44,000 copies/ml (4,700- 129,000). All but one of these specimens (4,700 copies/ml) were detected by the prototype second generation screening ELISA.

A total antibody positive specimens from high risk individuals were also tested by a prototype second generation ELISA using a single step specimen pre-treatment to dissociate immune complex. Overall sensitivity in antibody positive, RNA positive specimens was 91.2% (n=240). Moreover, 97% of specimens with RNA levels >20,000 copies/ml were detected by the ELISA (Figure 2).



**Figure 2** - Detection of HCV core antigen in viremic specimens from IVDA patients.

Additionally, serial specimens from 40 patients undergoing Interferon (IFN) or combination therapies were tested for HCV core antigen by a quantitative ELISA. Levels of HCV core antigen correlated closely with RNA and also with viral clearance in individuals responding to therapy (Figure 3).



**Figure 3** - Representative series from an individual undergoing IFN treatment

The current HCV antigen screening test will identify the vast majority of individuals in the antibody negative, RNA positive “window phase” of infection. Prototype second generation tests demonstrated greater analytical sensitivity for HCV and clinical sensitivity that was virtually the same as RNA testing. Using a simple, on-step, specimen pre-treatment procedure, HCV core antigen can be detected with equal sensitivity in antibody positive patients. This test appears to have great utility for diagnosis of HCV infection and for monitoring patients undergoing therapy.

#### References

1. PETERSON, J., GREEN, G., IIDA, K., CALDWELL, B., KERISON, P., BERNICH, S., AOYAGI, K., LEE, S.R. Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative “window” phase of infection. *Vox Sang* 2000,78: 80-85.
2. LEE, S.R., PETERSON, J., NIVEN, P., BAHL, C., PAGE, E., DeLEYS, R., GIORDANO-SCHMIDT, D., BAGGETT, D., GREEN, G. Efficacy of an HCV core antigen ELISA for the identification of “window phase” blood donations. *Vox Sang*. *in press*.
3. COUROUCE, A.M., LeMARREC, N., BOUCHARDEAU, F., RAZER, A., MANIEZ, M., LAPERCHE, S., SIMON, N. Efficacy of hepatitis C virus core antigen detection during the pre-seroconversion window. *Transfusion*, *in press*.

4. ROTH, W.K., WEBER, M., SEIFREID, E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus and HIV-1 in a blood bank setting. *Lancet* 1999,353: 359-363.
5. AOYAG, K., OHUE, C., IIDA, K., KIMURA, T., TANAKA, E., KIYOSAWA, K., YAGI, S. Development of a simple and sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1999,37: 1802-1808.

## **ANALISI DINAMICA DELLA RISPOSTA ANTICORPALE: SIGNIFICATO CLINICO**

Maurizia Rossana Brunetto, Barbara Coco, Filippo Oliveri, Pietro Ciccorossi, Piero Colombatto, Anna Maria Maina, Giovanna Moscato, Ferruccio Bonino  
*Unità Operativa di Gastroenterologia ed Epatologia, Spedali Riuniti di Santa Chiara, Pisa*

### **Introduzione**

Il virus dell'epatite C è stato il primo agente infettivo il cui acido nucleico è stato identificato e caratterizzato prima delle proteine virali, grazie all'utilizzo di sofisticate tecniche di biologia molecolare, che hanno permesso di clonare prima una porzione corrispondente ad un epitopo immunodominante e quindi di identificarne l'intera sequenza (1). Le modalità di isolamento di questo virus hanno risentito sicuramente dell'evoluzione delle tecnologie a disposizione dei ricercatori, ma sono anche la conseguenza di alcuni aspetti dell'infezione da HCV, caratterizzata da bassa espressione di antigeni virali e da risposta anticorpale multivalente, che maschera spesso il virus in immunocomplessi (2). A seguito di tali caratteristiche, fino ad ora l'unica possibilità per dimostrare direttamente la presenza del virus si è basata sull'identificazione dell'acido nucleico virale e solo di recente è diventato possibile dimostrarne l'antigene nucleocapsidico circolante.

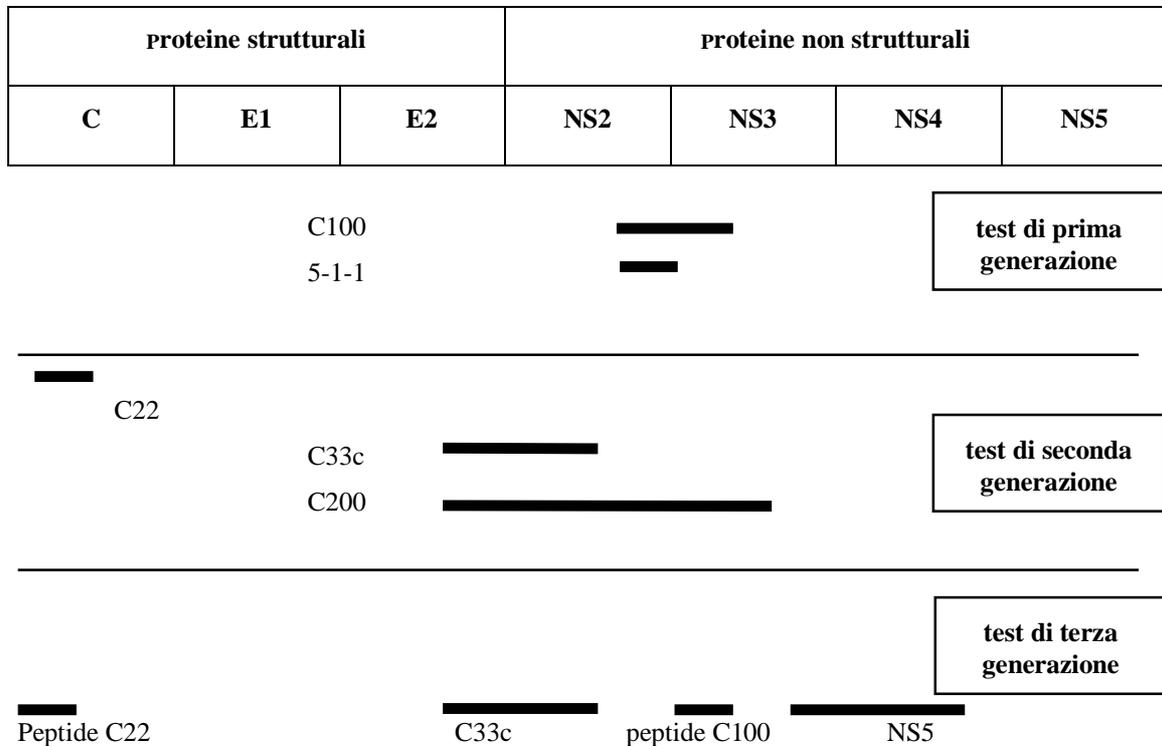
La risposta anticorpale che si sviluppa in corso di infezione è ampiamente sfruttata in ambito diagnostico, in particolare per identificare i soggetti con avvenuta esposizione ad HCV (1,3). Tuttavia, a fronte di un esteso utilizzo diagnostico, le caratteristiche quali-quantitative della produzione anticorpale sono state poco studiate: i dati presenti in letteratura suggeriscono che la risposta anticorpale (rivolta contro le proteine strutturali e non) sia ristretta prevalentemente all'isotipo, IgG1 (in corso di infezioni virali usualmente la risposta iniziale di tipo IgG1 si trasforma in risposta IgG 2-4), a basso titolo (raramente  $>1:5000$ , in corso di infezione da HBV i titoli di anti-HBc sono spesso di  $1:10^6$ ) e con comparsa ritardata rispetto al momento del contagio. Tali anomalie potrebbero essere la conseguenza di una strategia virale atta a garantire la persistenza virale attraverso un sovvertimento della risposta umorale, indotta attraverso una ridotta carica virale/antigenica e l'elevata variabilità di epitopi rilevanti, quali HVR-1 di E2 (4).

L'atipicità della risposta anticorpale assieme alla difficoltà finora incontrata nel correlare un preciso profilo anticorpale con fasi differenti dell'infezione (ove si escluda la positività isolata per anti-core) e all'estrema variabilità virale che rende difficile l'individuazione di antigeni che non siano genotipo-specifici (si pensi ai test di I generazione) giustificano almeno parzialmente il limitato utilizzo dell'immunometria nella gestione del soggetto con infezione da HCV.

### Identificazione dell'infezione da HCV: determinazione dello spettro della risposta anticorpale nei confronti di proteine virali

A tal scopo vengono utilizzate tecniche di immunoenzimatica (ELISA) o immunoblotting che permettono di dimostrare la presenza di anticorpi circolanti rivolti contro proteine strutturali (core, envelope) e non strutturali (NS3,NS4,NS5) del virus (Figura 1).

**Figura 1 -** Rappresentazione schematica delle proteine dell'HCV e degli antigeni utilizzati nei test diagnostici



Il test ELISA di III generazione contiene peptidi sintetici corrispondenti ad epitopi del core (c22c) e c100-3 e antigeni ricombinanti di NS5 e NS3 e in studi di confronto ha dimostrato una sensibilità e specificità superiore al test di II generazione. Anche i test in immunoblotting di III generazione sono caratterizzati da maggiore sensibilità rispetto ai test di II generazione grazie all'introduzione di una proteina ricombinante (NS5) e di un peptide sintetico al posto della proteina sintetica precedentemente utilizzata per la determinazione di NS4 (c-100). Il cambiamento nell'epitopo di NS4 è stato introdotto per aumentare la sensibilità nella determinazione di anti-c100 in soggetti infettati da genotipo diverso da 1, in quanto questa risultava scarsa nel test di II generazione (5).

L'informazione ottenuta con il test anti-HCV ELISA è dal punto di vista virologico piuttosto generica, in quanto indica semplicemente l'avvenuta esposizione al

virus e nulla dice dell'attuale stato dell'infezione. Utilizzato nello screening di popolazione il test risulta positivo anche in soggetti che mantengono una semplice risposta anticorpale anamnesticamente ma non hanno più infezione attiva (6) e non è quindi utile per l'esclusiva individuazione dei soggetti con replicazione virale ed eventuale malattia. Maggiori informazioni sulla fase dell'infezione possono essere ottenute con l'immunoblotting che, permettendo la determinazione in modo semi-quantitativo delle singole reattività anticorpali rivolte contro le proteine virali (strutturali e non), fornisce informazioni aggiuntive e può aiutare il clinico nell'inquadramento dello stadio dell'infezione. Una reattività completa nei confronti di tutti gli antigeni presenti nel test correla con la presenza di infezione e replicazione virale, al contrario una positività anticorpale rivolta esclusivamente contro il "core" può indicare la persistenza di memoria anticorpale anamnesticamente in soggetto con pregressa infezione. Negli ultimi anni la sempre maggiore diffusione delle tecniche di biologia molecolare per la ricerca dell'HCV-RNA ha progressivamente ridotto l'utilizzo del test in immunoblotting. Tuttavia, il ruolo della determinazione della risposta anticorpale nella gestione del soggetto con infezione da HCV dovrebbe essere riconsiderato in quanto il suo studio ci permette di analizzare meglio l'interazione virus ospite.

### **Identificazione del danno HCV-indotto: determinazione della risposta anticorpale di classe IgM nei confronti della proteina core**

I virus epatitici non sono direttamente citopatici e quindi la dimostrazione di replicazione virale non permette di creare un nesso causale diretto fra eventuale danno epatico e virus: il marcatore che nella pratica clinica viene utilizzato per giungere con elevato livello di confidenza ad una diagnosi eziologica è l'anticorpo di classe IgM rivolto contro gli antigeni virali bersaglio della risposta cellulo-mediata. L'utilità di tale marcatore surrogato del danno immuno-mediato virus indotto nella gestione del paziente con danno epatico e infezione virale è stato ampiamente dimostrato in corso di infezione da HBV (7-9). Nel caso dell'infezione da HCV, dal momento che il virus è implicato anche nella patogenesi di manifestazioni extraepatiche (quali la crioglobulinemia di tipo II), la positività di IgM anti-core potrebbe essere indice di una patologia HCV indotta non necessariamente epatica: si impongono quindi studi volti a approfondire il reale ruolo diagnostico di IgM anti-HCV nella diagnosi eziologica del danno epatico. La metodica commerciale per la determinazione degli anticorpi di classe IgM rivolti contro l'antigene "core" si basa su test competitivo con antigene in fase solida (10). I limiti principali di tale allestimento sono una sensibilità relativamente bassa, dal momento che il fattore limitante è la cattura dell'anticorpo da parte dell'antigene presente sulla fase solida (e quindi la superficie di riconoscimento è limitata) e il rischio di un certo grado di aspecificità (mancando il doppio riconoscimento "a sandwich" dell'anticorpo, come avviene per il test IgM anti-HBc), rischio al quale si ovvia mantenendo alto cut-off positivo/negativo e penalizzando ulteriormente la sensibilità della determinazione. Il limite di sensibilità era particolarmente evidente nel test di prima generazione, tanto che circa il 50% dei

soggetti con malattia da HCV circolano livelli di anticorpo non dosabili con tale metodica. Il test di seconda generazione, in grado di dare anche una valutazione semiquantitativa, risulta essere più sensibile e una percentuale del 60-70% dei pazienti con malattia da HCV risulta essere positivo. Purtroppo nei soggetti con danno epatico e infezione da HCV e negatività per l'anticorpo anti-core IgM, la diagnosi eziologica potrà essere raggiunta solo avvalendosi dell'uso combinato di più marcatori e con la valutazione istologica del fegato (11). Tuttavia, sulla base della nostra esperienza il contesto nel quale il monitoraggio dell'anticorpo ha dimostrato la massima utilità è stato nella diagnosi differenziale fra rigetto e recidiva epatitica nel paziente anti-HCV positivo sottoposto a trapianto epatico. L'infezione da HCV persiste in quasi tutti i pazienti sottoposti a trapianto, ma solo circa il 50% dei pazienti sviluppa un quadro francamente epatitico: nel caso di rialzo di transaminasi la dimostrazione di viremia non permette di differenziare i soggetti con recidiva epatitica dai pazienti con danno di altra eziologia. Al momento attuale solo la biopsia epatica permette di giungere ad una diagnosi, tuttavia l'indagine è invasiva e in una certa percentuale di casi non è dirimente. L'analisi delle fluttuazioni dell'anticorpo in un gruppo di 54 pazienti anti-HCV positivi seguiti presso il Centro Trapianti di Pisa ha dimostrato come l'incremento dei livelli di anticorpo abbia un'elevata accuratezza diagnostica nell'individuazione della recidiva epatitica. Tale osservazione se confermata in una casistica più ampia potrà permettere di effettuare la biopsia epatica solo nei pazienti che, in occasione di un rialzo delle transaminasi, non avranno un contemporaneo incremento dei livelli di IgM.

### **Monitoraggio del paziente affetto da epatite C: analisi dinamica della risposta anticorpale**

La gestione del paziente sottoposto a trattamento antivirale pone 2 principali problemi: l'individuazione della schedula terapeutica efficace nel singolo paziente e dei marcatori di persistenza della risposta o del rischio di recidiva. La misura quantitativa dell'HCV-RNA avvalendosi di tecniche standardizzate si sta dimostrando estremamente utile nel risolvere, almeno in parte, il primo problema. Il monitoraggio della viremia nelle prime fasi del trattamento permette di verificare l'efficacia della schedula terapeutica adottata ed è verosimile che a breve, grazie anche all'ausilio di modelli di analisi matematica della dinamica virale, sarà possibile giungere all'individualizzazione terapeutica. Lo studio dinamico della risposta anticorpale invece potrebbe concorrere al monitoraggio della risposta al termine del trattamento e soprattutto nel post-terapia. In uno studio condotto su 62 pazienti trattati con interferone il monitoraggio quantitativo dei livelli di IgG e IgM anti-core ha dimostrato come la caduta (uguale o maggiore al 50%) dei livelli di IgG anti-core al termine del trattamento correli significativamente con il mantenimento della risposta dopo la sospensione della terapia (Baldi M, dati non pubblicati). Inoltre, l'analisi semiquantitativa degli anticorpi rivolti contro proteine strutturali e non strutturali nel corso di un monitoraggio post-terapia di oltre 3 anni ha dimostrato la stretta correlazione fra persistenza della risposta e perdita della reattività per NS4 (osservata nell'83.3% dei casi) (12). Questi dati e la segnalazione che anche il

dosaggio di IgM anti-HCV può essere utile nel monitoraggio del paziente positivo sottoposto a trattamento con interferone, in quanto la risposta al trattamento correla con la caduta e negativizzazione persistente dell'anticorpo suggerisce l'opportunità di rivalutare l'utilizzo del monitoraggio della dinamica anticorpale (13). Infatti, in un soggetto immunocompetente la perdita di una reattività anticorpale, il cui mantenimento risulta dal costante riconoscimento delle proteine virali da parte del sistema immune, presuppone la mancata esposizione alla stesse proteine per un prolungato periodo di tempo, mentre la mancata determinazione dell'acido nucleico virale può dipendere dalla semplice fluttuazione dei suoi livelli al di sotto della soglia di sensibilità della tecnica utilizzata.

### Bibliografia

1. CHOO Q-L. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989, 244:359-362
2. HIJIKATA M. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* 1993;67:1953-58
3. KUO G. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of non-A,non-B hepatitis. *Science* 1989; 244:362-364
4. CHEN M. Limited Humoral Immunity in Hepatitis C Virus Infection *Gastroenterology* 1999;116:135-143
5. DE MEDINA M. Hepatitis C:diagnostic assays *in Seminars in Liver Disease* 1995;15,1:33-40
6. MANZINI P. Asymptomatic anti-HCV seropositive subjects include patients with chronic active hepatitis and individuals with normal liver: can we distinguish them? *J Hepatol* 1994;21:136-137
7. BRUNETTO M.R. The diagnostic significance of IgM antibody to hepatitis B core antigen, revisited. *Italian J Gastroenterol* 1988;20:167-70
8. BRUNETTO M.R. Monitoring the natural course and response to therapy of chronic hepatitis B with an automated semi-quantitative assay for IgM anti-HBc. *J Hepatol* 1993;19:431-436
9. COLLOREDO MELS G. Fluctuations of viremia, aminotransferases and IgM antibody to hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B patients with disease exacerbations. *Liver* 1994;14:175-181
10. NEGRO F. The fluctuations of hepatitis C virus RNA and IgM anti-HCV core serum levels correlate with those of alanine aminotransferases during the hepatitis relapses of patients treated with interferon *J Viral Hepatol* 1995,2:171-174
11. ASSOCIAZIONE ITALIANA PER LO STUDIO DEL FEGATO (AISF) Diagnostica molecolare dell'infezione da virus dell'epatiteC:applicazioni nella pratica clinica *Commissione Tecnologie Molecolari nella Diagnostica delle Epatopatie* 1996
12. SARACCO G.Hepatitis C virus markers in patients with long term biochemical and histological remission of chronic hepatitis. *Liver* 1994 Apr;14 (2):65-70
13. QUIROGA JA. Immunoglobulin M antibody to hepatitis c virus core antigen:correlations with viral replication, histological activity and liver disease outcome *Hepatology* 1995,22:1635-1640

**LO SCREENING DEL SANGUE: CONCETTI E METODOLOGIE**

Moderatori: Maria Orlando, Anna Lucia Massaro

## **STRATEGIA PER LA VALUTAZIONE E LA RIDUZIONE DEL RISCHIO RESIDUO DI EPATITE C ASSOCIATA ALLA TRASFUSIONE**

Claudio Velati (a), Alessandro Zanetti (a), Vittorio Carreri (b)

(a) *Dipartimento di Medicina Trasfusionale e di Ematologia, Sondrio, Istituto di Virologia, Università degli Studi di Milano*

(b) *Unità Organizzativa Prevenzione, Direzione Generale Sanità, Regione Lombardia*

### **I criteri per la sicurezza trasfusionale**

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha indicato per la giornata mondiale della salute per l'anno 2000 il tema della sicurezza trasfusionale sostanziandola nei seguenti aspetti: a) completa disponibilità di sangue, emocomponenti e plasmaderivati per tutti i malati che ne hanno necessità, b) la trasfusione è una terapia salva-vita e non deve trasformarsi in causa di malattia, c) il donatore è il punto di partenza di ogni programma di sicurezza. Numerosi sono gli aspetti che vengono oggi ritenuti alla base della sicurezza trasfusionale: la donazione volontaria, periodica, non remunerata, anonima, la rigorosa selezione del donatore, test di laboratorio di elevata sensibilità, l'impiego di materiali e di condizioni operative adeguate, procedure per il riconoscimento univoco delle unità e del malato, la separazione degli emocomponenti, l'inattivazione virale, una politica di buon uso del sangue.

Tale approccio ha fortemente ridotto, ma non completamente eliminato, il rischio di trasmissione di infezioni virali attraverso la trasfusione di sangue o di emoderivati: infatti attualmente il rischio di trasmettere HIV, HCV, HBV attraverso la trasfusione può essere attribuito quasi esclusivamente alle donazioni fatte durante il periodo pre-seroconversione (periodo finestra) durante il quale non sono individuabili anticorpi contro i virus, alla presenza di portatori di infezione che non sieroconvertono o di varianti di virus che portano alla produzione di anticorpi non riconosciuti dai test sierologici disponibili.

### **La valutazione del rischio residuo di trasmissione di infezioni virali con la trasfusione**

La quantificazione del rischio trasfusionale residuo per malattie virali trasmissibili può essere effettuata sulla base di studi di follow up su soggetti trasfusi o di confronto tra la metodologia laboratoristica di screening in uso e altre di maggiore sensibilità. E' possibile, in alternativa, una valutazione del rischio residuo sulla base dei dati epidemiologici della malattia, del grado di precocità di diagnosi dei test utilizzati e di modelli matematici adeguati.

Secondo i modelli matematici proposti da Lackritz et al.(1) e da Schreiber et al. (2, 3), il rischio trasfusionale residuo, espresso come numero di unità infette per numero di unità donate, si ottiene moltiplicando l'incidenza per il periodo finestra espresso come frazione di anno .

Secondo il modello di Lackritz il rischio di trasmissione di HIV negli Stati Uniti, calcolato negli anni 1992-1993, è di 1 unità infetta su 450.000-660.000 unità testate.

Nello studio di Schreiber il rischio calcolato per il periodo 1991-1993 negli Stati Uniti è pari a 1 su 493.000 (95% CI 202.000-2.778.000) per HIV, 1 su 103.000 (95% CI 28.000-288.000) per HCV e 1 su 63.000 (95% CI 31.000-147.000) per HBV.

Questo modello è stato utilizzato da Pillonel et al. (4) che hanno stimato un rischio trasfusionale residuo in Francia nel periodo 1994-1996 pari a 1 su 1.000.000 (295.000-10.000.000) per HIV, 1 su 200.000 (97.000-530.000) per HCV e 1 su 180.000 (66-560.000) per HBV. In Germania il rischio trasfusionale residuo, stimato da Koerner et al. (5) è pari a 1 su 200.000 (97.000-1.400.000) per HCV e 1 su 250.000 (170.000-400.000) per HBV.

L'elaborazione del rischio trasfusionale residuo in Lombardia è stata effettuata secondo il modello di Lackritz per HIV e HCV e di Schreiber per HBV (Tabella 1).

**Tabella 1** - Valutazione del rischio trasfusionale residuo calcolato sulla base dei dati epidemiologici raccolti nel periodo 1996- 1999

	<b>Rischio</b>	<b>95% C.I.</b>
<b>HIV</b>	1: 454.545	344.827 – 666.666
<b>HCV</b>	1: 119.047	95.592 – 169.491
<b>HBsAg</b>	1 : 71.428	50.251 – 107.526

### **L'introduzione di test di amplificazione genica (NAT) nello screening delle donazioni**

Lo sviluppo di tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) e la loro applicazione alla ricerca del genoma virale nel plasma dei donatori permetterebbe di individuare le infezioni da HIV, HCV, HBV in una fase più precoce con una significativa riduzione del periodo finestra, in particolare per HCV, e di conseguenza del rischio trasfusionale.

In Tabella 2 è riportata la stima della riduzione del rischio trasfusionale in Lombardia se venissero introdotte metodiche di amplificazione genica nello screening dei donatori.

**Tabella 2** - Numero atteso di unità infette, ma negative ai test di screening (Elisa e NAT)

	Elisa		NAT	
	Periodo finestra (g)	Numero unità	Periodo finestra (g)	Numero unità
HCV	70	4,0	21	1,0
HIV	22	1,1	11	0,5
HBV	56	7,0	31	3,8

Il Decreto Ministeriale del 29/3/99 ha recepito la raccomandazione dei competenti organismi comunitari (CPMP/BWP/390/97) che prevedono la ricerca di HCV RNA nei pool di plasma finalizzati alla produzione di farmaci plasmaderivati. L'attuazione di tale Decreto incontra a livello nazionale difficoltà organizzative che impediscono la ricerca da parte dell'industria su pool di plasma di piccole dimensioni determinando, in caso di positività del test, l'eliminazione dell'intero batch di lavorazione. Inoltre si è creato un doppio livello di approfondimento diagnostico tra la selezione di plasma da avviare al frazionamento industriale ed i prodotti labili, cioè di impiego nel breve periodo (globuli rossi, piastrine, plasma per uso clinico).

Tale condizione ha portato alcuni paesi europei ad introdurre la ricerca di RNA del virus dell'epatite C quale test obbligatorio anche per la validazione di tutte le unità di sangue ed emocomponenti. In altri paesi sono state emanate indicazioni e linee guida allo scopo di verificare le effettive necessità e di predisporre le necessarie misure organizzative nelle strutture trasfusionali. Esistono ormai alcune significative esperienze condotte in paesi europei e negli Stati Uniti (6-8) che hanno evidenziato come l'introduzione di nuove metodiche comporti l'impiego di risorse aggiuntive e quindi la necessità di adeguate misure organizzative che consentano economie di scala anche in considerazione del fatto che analoghe modifiche potranno riguardare, a breve, altri virus (HIV e HBsAg). Tali esperienze sono, però, state condotte in nazioni caratterizzate dalla organizzazione del servizio trasfusionale in realtà di grandi dimensioni e dalla forte strutturazione centralizzata. L'Istituto Superiore di Sanità ha, pertanto, proposto uno studio di fattibilità per l'Italia e anche la Regione Lombardia ha promosso un progetto di fattibilità della ricerca di componenti del virus C su tutte le unità di emocomponenti. Nel contempo alcuni kit diagnostici basati sulla tecnica di amplificazione genica (NAT) per la ricerca di HCV sono stati registrati presso il Ministero della Sanità (o sono in corso di registrazione) e del tutto recentemente è stato registrato anche un nuovo test per la ricerca di antigeni del virus dell'epatite C.

## **Progetto per il miglioramento della sicurezza trasfusionale in Lombardia**

*Scopi del progetto.* – 1) Assicurare la possibilità da parte dell'industria di eseguire il test per la ricerca di HCV RNA su pool di plasmi prima della formazione del batch di lavorazione al fine di consentire l'eliminazione di ridotte quantità di plasma e l'identificazione del donatore portatore dell'infezione da parte della struttura trasfusionale.

2) Valutare nella realtà lombarda l'impatto che l'introduzione della tecnologia NAT nello screening dei donatori di sangue possa comportare in riferimento, principalmente, ai seguenti aspetti:

- livello di centralizzazione adottabile,
- esecuzione del test su pool, e sue dimensioni ottimali, o su singola unità,
- modalità di trattamento del campione dal momento del prelievo, durante la conservazione, l'invio, il trasporto e fino all'esecuzione del test,
- tempi di validazione delle unità con riferimento particolare ai componenti a scadenza più rapida (concentrati piastrinici),
- sequenze organizzative del risultato reattivo di un pool,
- strutturazione e organizzazione del laboratorio anche ai fini della sua autorizzazione,
- valutazione dei costi in relazione alle diverse soluzioni organizzative adottate.

Sono stati coinvolti nella sperimentazione della ricerca di HCV RNA su tutti gli emocomponenti 4 Dipartimenti di Medicina Trasfusionale e di Ematologia -DMTE- (due con sede in IRCCS, Policlinico di Milano e Policlinico di Pavia, uno con sede in un Azienda Ospedaliera, Bergamo, uno con sede in un Azienda Sanitaria Locale, Sondrio) che presentano condizioni paradigmatiche di aspetti geografici e organizzativi diversi, e una comprovata esperienza nell'esecuzione di metodiche di biologia molecolare. L'ipotesi di base del progetto è la scelta di un livello intermedio di centralizzazione delle attività diagnostiche NAT, cioè su base dipartimentale e quindi –di norma- provinciale. In particolare, tale progetto prevede una valutazione ed un consenso preliminare dei centri partecipanti sui principali aspetti operativi ed un rigoroso monitoraggio delle attività al fine di fornire alla Regione elementi utili alla eventuale estensione a tutti i DMTE di tali procedure.

*La fase di preparazione.* - Il progetto ha visto una fase di preparazione a livello regionale (Febbraio - Aprile 2000): stesura generale del progetto, predisposizione di una lista di requisiti tecnici sulla base dei quali procedere nelle diverse realtà operative, comunicazione da parte dell'Assessorato ai Direttori aziendali, coinvolgimento dei responsabili commerciali delle ditte interessate a partecipare al progetto e successive riunioni per concordare le modalità della collaborazione.

Ha inoltre visto il successivo sviluppo nelle diverse sedi operative (Aprile - Giugno 2000): atti per autorizzazione allo svolgimento della sperimentazione, preparazione del personale medico ed infermieristico del SIMT e delle Sedi periferiche di raccolta, predisposizione di un protocollo per la raccolta e l'invio del campione e la validazione

delle unità, sistemazione dei locali destinati alla sperimentazione per la ricerca di HCV RNA, predisposizione delle apparecchiature.

Sono state sperimentate due metodiche in periodi successivi, COBAS Ampliscreen HCV test 2.0, Roche Diagnostics e CHIRON TMA HIV-1/HCV Assay che hanno comportato acquisizioni di apparecchiature specifiche, fasi di addestramento diverse per il personale in sede e fuori sede, predisposizione di ambienti diversi

*La fase di sperimentazione.* – La fase operativa ha visto trattare i seguenti aspetti:

a) descrizione della rete geografica coinvolta, b) definizione della tipologia dei donatori esaminati (in prevalenza solo i donatori periodici già noti), c) tipologia delle provette utilizzate (PPT Becton Dickinson), d) modalità della identificazione dei campioni (applicazione di etichette “bar code”), e) modalità della preparazione del campione, f) modalità del trasporto, g) modalità di accettazione dei campioni, h) organizzazione del laboratorio di biologia molecolare (per metodi analitici, per locali), i) le modalità della preparazione dei pool (manuale, automatica) o delle determinazioni in singolo (Chiron), l) trattamento dei campioni fino al conseguimento del risultato, m) modalità di preparazione e di conservazione dei campioni destinati allo stoccaggio, n) tempi di esecuzione dei test, o) flusso di lavoro in riferimento ai tempi di validazione delle unità di emocomponenti (in giornata, il giorno successivo al prelievo), p) fattibilità della validazione biologica in unica sede e conseguenze sulla disponibilità di emocomponenti presso le sedi periferiche, q) modalità di trasmissione dei risultati alle sedi ove vengono validate le unità, valutazione dei costi in funzione delle dimensioni della attività.

## Bibliografia

1. LACKRITZ, EM, SATTEN, GA, ABERLEE-GRASSE, J. et al. Estimated risk of transmission of the human immunodeficiency virus by screened blood in the United States. *N Engl J Med* 1995,333: 1721-1725.
2. KLEINMAN, SH, BUSCH, MP, KORELITZ, JJ, SCHREIBER, GB. The incidence/window period model and its use to assess the risk of transfusion-transmitted human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infection. *Transfusion* 1997,11: 155-172.
3. SCHREIBER, GB, BUSCH, MP, KLEINMAN, SH, KORELITZ, JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 1996,334: 1685-1690.
4. PILLONEL, J, SAURA, C, COUROUCÉ, AM. Screening of viral markers for HIV, HBV and HCV infections in blood donors in France and residual risk of viral transmission by blood transfusion. *Eurosurveillance* 1998,3 (7): 76-79.
5. KOERNER, K, CARDOSO, M, DENGLER, TH, KEROWGAN, M, KUBANEK, B. Estimated risk of transmission of hepatitis C virus by blood transfusion. *Vox Sang* 1998,74: 213-216.
6. ROTH, WK, WEBER, M, SEIFRIED, E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus and HIV-1 in a blood-bank setting. *Lancet* 1999,353: 359-363.
7. BUSCH, MP. HIV, HBV and HCV : new developments related to transfusion safety. *Vox Sang* 2000,78 (suppl 2): 253-256.
8. ROTH, WK, BUHR, S, DROSTEN, C, SEIFRIED, E. NAT and viral safety in blood transfusion. *Vox sang* 2000,78 (suppl 2): 257-259.

## **RISULTATI DELLO STUDIO DI FATTIBILITA' PER L'APPLICAZIONE DELLE TECNICHE NAT ALLO SCREENING DEL SANGUE**

Michelina Miceli (a), Paola Ghiazza (b), Emilio Mannella (a), Anna Lucia Massaro (b), Maria Orlando (c), Maria Rapicetta (c), Giuliano Gentili (c), Paola Verani (c).

*Gruppo di Studio per l'applicazione delle tecniche NAT allo screening del sangue.*

*In collaborazione con:*

*P. Bonino (b), M. Trivè (b), F. Grosso (b), M. Millesimo (b), L. Calosso (b), R. Marinoni (b), P. Iudicone (a), M. Testi (a), A. Moschetti (a), A. Candido (a), I. Antigoni (a), C. Amedeo (a), G. Mercurio (a), G. Girelli (d), G. Isacchi (e), E. Mauro (f).*

(a) *Centro Nazionale Trasfusione Sangue - Croce Rossa Italiana*

(b) *Dipartimento Trasfusionale AVIS Azienda Ospedaliera OIRM S. Anna, Torino*

(c) *Istituto Superiore di Sanità*

(d) *Centro Trasfusionale Universitario "La Sapienza" di Roma*

(e) *Centro Trasfusionale Ospedale Bambino Gesù*

(f) *Centro Trasfusionale Ospedale Militare Celio*

### **Premessa**

I dati riportati dalla letteratura scientifica degli ultimi anni indicano come il rischio di infezioni da HBV, HCV e HIV associate alla trasfusione si sia drasticamente ridotto ma non fino a scomparire. La valutazione degli effetti associati a questo rischio residuo ha condotto alla pubblicazione nel marzo 1998, da parte dell'Agenzia Europea per la validazione dei prodotti medicinali (EMEA, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), della Raccomandazione CPMP/BWP/390/97 con la quale sollecitava i Paesi membri affinché, dal 1° Luglio 1999, fossero rilasciati sul mercato soltanto lotti di emoderivati ottenuti da pool di plasma risultati non reattivi per HCV-RNA mediante tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) utilizzando metodi validati per adeguate specificità e sensibilità. La successiva Linea Guida per la validazione delle metodiche NAT destinate alla rilevazione di HCV-RNA in pool di plasma (PA/PH/OMCL (98) 22) elaborata dall' *European Network of Medicines Control Laboratories* ha definito i criteri di validazione e ha stabilito le modalità di valutazione dell'adeguatezza delle procedure analitiche di amplificazione genica per la rilevazione qualitativa della presenza del virus HCV. L'applicazione di tali raccomandazioni in Germania è stata anticipata al mese di aprile ed estesa anche ai concentrati eritrocitari e piastrinici (deliberazione PEI 04/04/1997), al fine di uniformare il grado di sicurezza di tutti i prodotti terapeutici derivati dal sangue; in Olanda è entrata in vigore nel giugno 1999. In Francia è stato recentemente approvato il decreto che rende obbligatoria la ricerca del genoma virale sia per HCV che per HIV su tutte le unità di sangue. Altri Paesi stanno valutando l'opportunità di provvedimenti analoghi. In Italia il D.M. 29 Marzo 1999 ha recepito la Raccomandazione Europea e la relativa Linea Guida decretando:

*Art. 1* – I lotti di prodotti emoderivati esaminati ed approvati successivamente al 30 giugno 1999, saranno prodotti da pool di plasma risultati negativi per HCV-RNA mediante tecnica di amplificazione genica, opportunamente aggiornata per sensibilità e convalidata ai sensi dell'art.2 del presente decreto. Dal 1° luglio 1999 i certificati di controllo di Stato (*batch release*) sono emessi dall'Istituto Superiore di Sanità unicamente in presenza delle condizioni di cui al presente comma.

*Art. 2* – .Validazione dei metodi

*Art. 3* - Include tra i Controlli di Stato per il plasma destinato alla produzione di plasmaderivati l'HCV-RNA.

L'applicazione del Decreto Ministeriale ha posto problemi di natura etica e medico-legale in considerazione del diverso livello di sicurezza che si è venuto, di fatto, a configurare tra la terapia trasfusionale con plasmaderivati testati per HCV-RNA rispetto alla trasfusione con emocomponenti labili (piastrine, globuli rossi e plasma fresco congelato) attualmente non testati. Pertanto, l'Istituto Superiore di Sanità ha deciso di affidare ad un gruppo di lavoro interno al Comitato Tecnico Scientifico (D.M. Sanità 01/09/95) l'incarico di condurre uno "Studio di Fattibilità" finalizzato alla valutazione e verifica operativa dell'introduzione del test per la rilevazione di HCV-RNA nella validazione biologica delle unità di sangue per un periodo di tempo sufficiente a misurare i costi, l'impatto organizzativo e gli aspetti di gestione dell'informazione. Sono stati individuati a tale scopo il Centro Nazionale Trasfusione Sangue della CRI di Roma e il Dipartimento Trasfusionale AVIS A.O. O.I.R.M. S. Anna di Torino, in quanto strutture sufficientemente dimensionate e con adeguata esperienza di laboratorio nel settore della biologia molecolare.

Poichè il rischio trasfusionale residuo per le infezioni da HCV rimane prevalentemente legato al lungo periodo di sieroconversione (mediamente 80 giorni), l'applicazione delle metodiche NAT può evidenziare condizioni di infezioni recenti, che non presentano ancora alterazioni delle transaminasi e che non sono ancora rilevabili con i tradizionali marcatori virali specifici (Ab) utilizzati per la validazione biologica del sangue, con una riduzione della "fase finestra" che è stata stimata di circa 50 giorni. Inoltre, l'elevata sensibilità della NAT consente la sua applicazione a pool costituiti da più campioni provenienti da singole donazioni, anche in considerazione dell'elevata carica virale nella fase iniziale d'infezione da HCV e della straordinaria velocità di replicazione del virus.

Inizialmente è stata condotta una indagine conoscitiva per individuare i test di amplificazione genica disponibili in Italia e applicabili allo screening delle donazioni. Attualmente sono presenti presso l'ISS due kit in attesa del parere di idoneità: il kit ROCHE COBAS AMPLICOR HCV qualitativo (versione 2.0 modificata) e il kit CHIRON TMA HIV-1/HCV RNA qualitativo.

Il programma dello "Studio di Fattibilità" ha previsto la valutazione di entrambi i test.

## Protocollo operativo

Per entrambe le metodiche lo studio si è articolato in:

- a) una fase preliminare durante la quale sono stati messi a punto la raccolta, l'identificazione e la gestione dei campioni, è stata acquisita la strumentazione necessaria e sono state organizzate le aree di lavoro;
- b) una successiva fase per la formazione del personale, la familiarizzazione con le metodiche adottate per lo studio, la validazione del processo analitico, la definizione della dimensione dei pool e la verifica della sensibilità dei metodi utilizzati;
- c) una terza fase in cui lo screening HCV-RNA è stato introdotto nella routine giornaliera con il coinvolgimento di diverse strutture trasfusionali.

Sono state identificate due differenti **aree di lavoro** dedicate rispettivamente alla pre e alla post-amplificazione, organizzate con tutta la strumentazione necessaria.

**Gli operatori** sono stati addestrati mediante corsi di formazione presso le sedi delle ditte produttrici dei test utilizzati durante lo studio e validati mediante apposito "Proficiency Test". Successivamente, le metodiche sono state validate in entrambi i laboratori secondo le Linee Guida per l'applicazione della metodica NAT allo screening di HCV-RNA utilizzando lo Standard dell'ISS HCV-RNA 0498 (1700 UI/mL) calibrato verso lo Standard Internazionale WHO 96/790 genotipo 1.

Nello **screening di routine** il test Cobas Amplicor HCV-RNA versione 2.0 modificata con ultracentrifugazione (Roche) è stato eseguito su pool di plasma di dimensioni non superiori a 20 campioni. Per la preparazione del pool è stato utilizzato il campionatore automatico Tecan Genesis dotato di un software di gestione dei pool, preventivamente validato per accuratezza e precisione della dispensazione. Il test TMA HIV-1/HCV-RNA (Chiron Gen-Probe) è stato eseguito su singolo campione utilizzando un altro campionatore Tecan Genesis dotato di software specifico per la metodologia TMA.

## Raccolta e invio dei campioni

*CNTS – CRI, Roma.* - Complessivamente sono stati testati 46.624 campioni di donatori *random* prelevati nei seguenti Centri :

- Centro Trasfusionale Universitario (La Sapienza) - Roma N. 2929 campioni
- Centro Trasfusionale Ospedale Bambino Gesù - Roma N. 1160 campioni
- Centro Trasfusionale Militare Ospedale Celio - Roma N. 1589 campioni
- Gruppo Donatori CRI – Roma \*
- Gruppo Donatori CRI Palazzolo (Brescia) – Roma \*
- Centro Trasfusionale S. Eugenio CRI – Roma \*
- Centro Trasfusionale S. Camillo CRI – Roma \*
- Centro Trasfusionale S. Spirito CRI – Roma \*
- Centro Trasfusionale S. Filippo CRI– Roma \*
- Centro Trasfusionale Regina Elena CRI– Roma \*

- Unità Mobili CRI e AVIS - Roma e provincia\*
- \* per un totale di N. 40.946 campioni

Tutti i campioni, ad eccezione di quelli provenienti dal CT Celio, sono stati raccolti in tubi con EDTA e sono stati conservati a temperatura ambiente per non più di 6 ore dal prelievo, o a 4°C in caso di tempi di conservazione più lunghi, comunque non oltre le 72 ore. I campioni del CT Celio sono stati raccolti in provette VACUTAINER PPT contenenti gel separatore, centrifugati prima dell'invio e conservati nelle condizioni suindicate. I campioni relativi alle **procedure di piastrinoaferesi** provenivano esclusivamente dal Servizio Aferesi dell'Ospedale S. Camillo (che provvede alle esigenze dei Reparti di Ematologia dello stesso Ospedale S. Camillo e dell'Ospedale S. Eugenio di Roma) che ha previsto, durante la fase dello studio, le scorte necessarie per eventuali urgenze e/o ritardi nel rilascio dei risultati dello screening HCV-RNA. Il CTU ha preferito escludere dallo studio le piastrinoaferesi da loro prodotte, per evitare, in caso di urgenze, l'assegnazione del prodotto senza il risultato del test HCV-RNA eventualmente ancora in corso.

*Dipartimento Trasfusionale AVIS Azienda Ospedaliera O.I.R.M. S. Anna, Torino.*  
- Complessivamente sono stati testati 20.307 campioni di donatori *random* prelevati in provette PPT (Plasma Preparation Tubes) raccolti in sede e fuori sede da unità di raccolta e autoemoteche sul territorio.

## Trasporto

Il trasporto dei campioni raccolti presso CT esterni al CNTS è avvenuto, tranne che per il CT Celio, tramite un mezzo di trasporto della CRI predisposto secondo le norme vigenti per il trasporto di sangue e materiale biologico. I campioni inviati dal CT Celio provenivano da raccolte di sangue effettuate sia sul territorio della regione Lazio che della regione Abruzzo. I campioni inviati dal Centro Trasfusionale Universitario e dal Centro Trasfusionale Osp. Bambino Gesù provenivano da raccolte di sangue effettuate prevalentemente a Roma e provincia. I campioni del Gruppo Donatori CRI Palazzolo sull'Oglio (Bs) sono stati trasportati in aereo in confezione a temperatura controllata e consegnati al laboratorio entro le 24 ore dal prelievo.

I campioni prelevati fuori dalla sede AVIS Azienda Ospedaliera O.I.R.M. S. Anna di Torino da unità di raccolta e autoemoteche sul territorio, sono pervenuti al laboratorio di validazione in appositi contenitori refrigerati entro le 6 ore dal prelievo.

## Identificazione dei campioni

Per quanto concerne l'identificazione dei campioni, quelli provenienti dalle raccolte della CRI, dell'AVIS di Roma e provincia e dell'AVIS Azienda Ospedaliera O.I.R.M. S. Anna di Torino hanno mantenuto il bar-code attribuito all'atto del prelievo, mentre i campioni provenienti dagli altri CT, pur mantenendo l'identificativo primario, in fase di accettazione sono stati etichettati con un secondo bar-code, appositamente

generato, specifico per ciascun centro e compatibile con il sistema informatico del CNTS.

### **Preparazione del pool**

Il test Cobas Amplicor HCV-RNA v 2.0 modificato con ultracentrifugazione è stato eseguito su minipool da 10 e da 20 campioni, preparati, nella prima fase, manualmente in cappa a flusso laminare e, successivamente, mediante il campionatore Tecan Genesis provvisto di *software* specifico per l'attività di *pooling*. In entrambi i casi i pool sono stati identificati mediante apposito bar-code ed è stata garantita la tracciabilità dei singoli campioni e del pool da essi formato mediante una lista di lavoro generata con il lettore di bar-code sia per i singoli prelievi che per il relativo pool.

I pool sono stati allestiti in provette SARSTEDT in area di lavoro dedicata alla preparazione dei campioni. Ogni pool è costituito da 1 ml di plasma (pool da 10 campioni  $\Rightarrow$  aliquote singole da 100  $\mu$ l, pool da 20 campioni  $\Rightarrow$  aliquote singole da 50  $\mu$ l) per un numero inferiore di campioni si raggiunge il volume finale di 1 ml con plasma negativo. In caso di un pool incompleto, è stato aggiunto un volume di plasma HCV-RNA/Ab negativo corrispondente al numero dei campioni mancanti.

### **Esecuzione del Test**

Lo screening HCV-RNA è stato eseguito in parallelo con i test sierologici. Nell'organizzazione del flusso di lavoro del CNTS-CRI la seduta di screening per la rilevazione di HCV-RNA è stata eseguita nel pomeriggio a partire dalle ore 14 - 15 per sei giorni a settimana ad esclusione della domenica, durante la quale sono stati solo raccolti e accettati i campioni. Il lunedì sono state effettuate due sedute di HCV-RNA screening, una al mattino, testando i campioni del giorno precedente, e una nel pomeriggio per i campioni prelevati nello stesso giorno.

Presso il Dipartimento Trasfusionale AVIS Azienda Ospedaliera O.I.R.M. S. Anna di Torino, considerato il numero elevato di prelievi giornalieri, l'organizzazione del lavoro si è articolata nell'arco delle 12 ore (8.00-20.00) con 3 turni operativi, mattina, pomeriggio, intermedio per l'esecuzione dei test utilizzando la metodica CHIRON e con 2, mattina e pomeriggio, per l'esecuzione della metodica Roche.

### **Validazione, registrazione e rilascio dei risultati**

Criteria di validazione della seduta analitica e dei singoli risultati:

- corrispondenza dei risultati dei calibratori, controlli positivi e negativi ai risultati attesi
- "Run Control" reattivo (Standard ISS 0498 ad una concentrazione pari a 3 x Cut-Off, comunque  $< 100$  UI/mL)

- controllo interno dei singoli campioni “reattivo” (entro il range prestabilito)
- valutazione del numero di campioni invalidi per singola seduta analitica.

Tutte le unità raccolte durante il periodo dello studio sono state rilasciate solo dopo la validazione dei risultati dei test sierologici e del test per HCV-RNA.

Utilizzando la tecnologia Chiron, le unità di sangue raccolte tra le ore 7,30 e le ore 14,30 sono state validate entro le ore 20 dello stesso giorno. I risultati delle restanti unità di sangue e delle donazioni effettuate nel pomeriggio sono stati disponibili entro le ore 15 del giorno successivo. Con la tecnologia Roche tutte le unità di sangue raccolte entro le ore 14,30 sono state validate entro le ore 20 dello stesso giorno o alle ore 8 del giorno successivo. Le donazioni del pomeriggio sono state validate entro le ore 17 del giorno successivo.

I risultati sono stati trasmessi per via informatica al sistema gestionale centrale per la validazione biologica delle unità. L’invio delle risposte ai centri afferenti al laboratorio del CNTS ma non gestiti dalla CRI e, quindi, non collegati in rete, è avvenuto tramite fax.

In caso di risultato positivo sono stati seguiti due algoritmi differenti (Figura 1) per le due metodiche. Le unità risultate inizialmente reattive in singolo (Chiron) vengono mantenute sospese fino a completamento dei test previsti dall’algoritmo specifico (24-36 ore dal prelievo). Le unità inserite in un pool inizialmente reattivo (Roche) vengono mantenute sospese fino a completa risoluzione del pool secondo l’algoritmo previsto (48 ore dal prelievo).

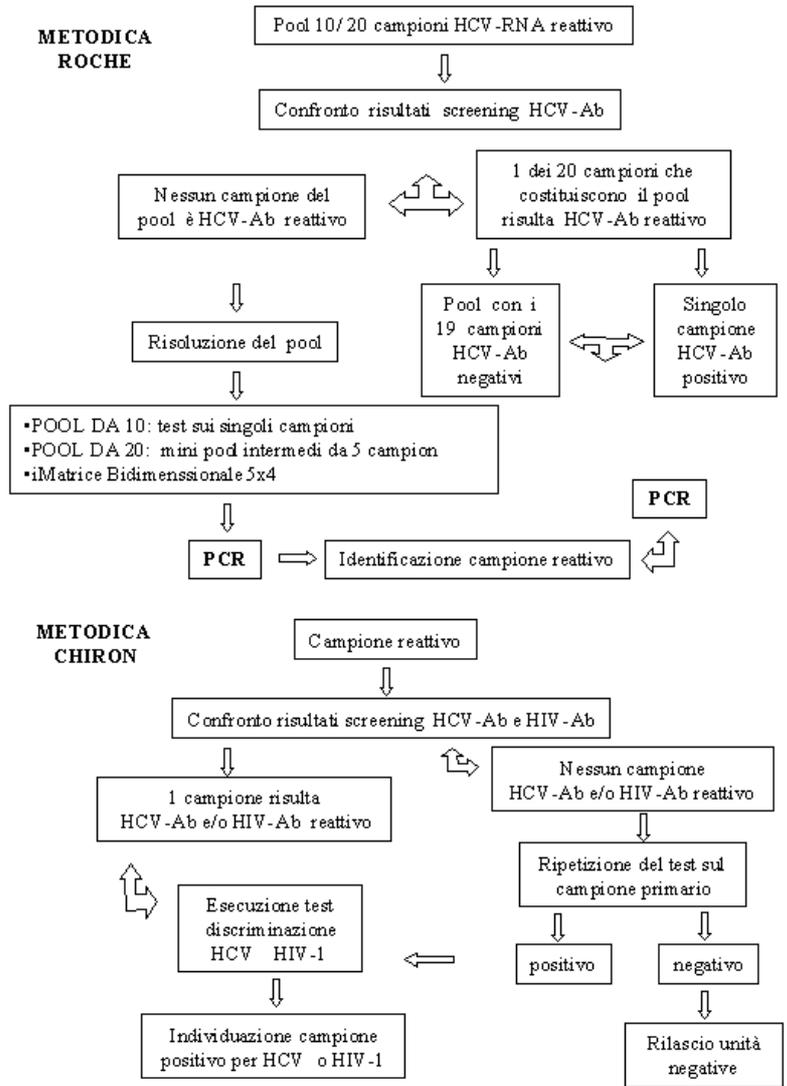
## Risultati dello studio

*Validazione dei metodi.* - (Linee Guida PA/PH/PCML (98) 22)

I risultati della validazione eseguita presso i 2 centri hanno consentito di verificare la **Robustezza** e la **Specificità** di entrambe le metodiche, l’assenza di **Cross-Contaminazione in fase operativa** e di rilevare i seguenti **limiti di sensibilità**:

		<b>CNTS-CRI</b>	<b>Dip. Trasf. Torino</b>
<b>Test Roche</b>	per pool da 20 campioni	CO = 23 UI/mL	CO = 7.81UI/mL
<b>Test Chiron</b>	per singolo campione	CO = 13 UI/mL	CO = 9.58 UI/mL

**ALGORITMI**



## Screening HCV-RNA

Nella fase di applicazione dello screening per HCV-RNA complessivamente sono stati testati:

- CNTS-CRI  $\Rightarrow$  46.624 donazioni, di cui 32.330 con il test Roche e 14.294 con il test Chiron Gen Probe
- Dipartimento Trasfusionale Azienda Ospedaliera O.I.R.M. S. Anna di Torino  $\Rightarrow$  20.307 donazioni, di cui 11.240 con metodo Roche e 9.067 con metodo Chiron Geb Probe.

## Cobas Amplikor HCV v.2.0 modificata con aggiunta di ultracentrifugazione ROCHE

*CNTS-CRI Roma*  $\Rightarrow$  32.330 campioni. - Sono stati preparati n. 2025 pool di campioni di plasma, di cui 649 da 10 campioni e 1376 da 20 campioni ciascuno e sono stati utilizzati complessivamente n.29 Kit da 96 test.

- |   |            |          |
|---|------------|----------|
| • N° sedute   | <b>316</b> |          |
| • N° sedute invalide*   | <b>14</b>  | (4.4%)   |
| * 5 sedute $\Rightarrow$ controllo positivo invalido                    |            |          |
| * 5 sedute $\Rightarrow$ <i>run control</i> invalido                    |            |          |
| * 1 seduta $\Rightarrow$ errore nella fase di preparazione del campione |            |          |
| * 2 sedute $\Rightarrow$ errori nella fase di rilevazione               |            |          |
| * 1 seduta $\Rightarrow$ problemi tecnici dello strumento               |            |          |
| • N° pool invalidi  | <b>26</b>  | (1.3%)   |
| • N° pool inizialmente reattivi   | <b>25</b>  | (1.2%)   |
| • N° pool falsi positivi  | <b>1</b>   | (0.05%)  |
| • N° <b>campioni confermati reattivi</b>                                | <b>24</b>  | (0.074%) |
| $\Downarrow$  |            |          |
| • N° campioni HCV-RNA pos HCV-Ab pos                                    | <b>24</b>  | (0.074%) |
| • N° <b>campioni HCV-RNA pos HCV-Ab neg</b>                             | <b>0</b>   |          |

Inoltre il test di screening sierologico (MEIA Abbott) ha rilevato, tra i 32.330 campioni, **85** (0.26%) HCV-Ab positivi o borderline, confermati successivamente al test RIBA (Ortho) positivi o indeterminati, che erano risultati HCV-RNA negativi.

- |  |           |         |
|--|-----------|---------|
| • N° campioni HCV-RNA neg HCV-Ab pos/bl e RIBA pos/ind | <b>85</b> | (0.27%) |
|--|-----------|---------|

## Dipartimento Trasfusionale AVIS

*A.O. O.I.R.M. S. Anna - Torino*  $\Rightarrow$  11.240 campioni. - Sono stati preparati n.562 pool di campioni di plasma da 20 campioni ciascuno.

- |                    |           |         |
|--------------------|-----------|---------|
| • N° pool invalidi | <b>10</b> | (1,77%) |
|--------------------|-----------|---------|

• N° pool inizialmente reattivi	<b>4</b>	(0,71%)
• N° pool falsi positivi	<b>0</b>	
• N° campioni confermati reattivi	<b>4</b>	(100%)
↓		
• N° campioni HCV-RNA pos HCV-Ab pos	<b>4</b>	(0.035%)
• <b>N° campioni HCV-RNA pos HCV-Ab neg</b>	<b>0</b>	

### HIV/HCV TMA - Chiron-GenProbe

*CNTS-CRI Roma ⇒ 14.294 campioni.*

• N° sedute	<b>195</b>	
• N° sedute invalide*	<b>5</b>	(2.5%)
*4 sedute ⇒ errori tecnici (dispensazione Probe/Selection)		
*1 seduta ⇒ condizioni non idonee (temperatura bagnomaria < 60°C)		
• N° test invalidi **	<b>81</b>	(0.56%)
**51 errori durante la procedura analitica		
**30 errore nella fase di rilevazione		
• N° campioni inizialmente reattivi	<b>36</b>	(0.25%)
• N° campioni falsi positivi	<b>25</b>	(0.17%)
• <b>N° campioni confermati reattivi</b>	<b>11</b>	(0.08%)
(Discriminatory Test)		
↓		
⇒ N° campioni HCV-RNA pos HCV-Ab pos	<b>8</b>	(0.05%)
⇒ N° campioni HIV-RNA pos HIV-Ab pos	<b>3</b>	(0.02%)
• <b>N° campioni HCV-RNA pos HCV-Ab neg</b>	<b>0</b>	
• <b>N° campioni HIV-RNA pos HIV-Ab neg</b>	<b>0</b>	

Inoltre il test di screening sierologico (MEIA Abbott) ha rilevato, tra i **14.294** campioni, **50** (0.35%) HCV-Ab positivi o borderline, confermati successivamente al test RIBA (Ortho) positivi o indeterminati, che erano risultati HCV-RNA negativi.

### Dipartimento Trasfusionale AVIS

*Azienda Ospedaliera O.I.R.M. S. Anna - Torino ⇒ 9067 campioni*

• N° sedute	<b>117</b>	
• N° sedute invalide	<b>6</b>	(5.1%)
• N° test invalidi	<b>40</b>	(0.46%)
• N° campioni inizialmente reattivi	<b>25</b>	(0.27%)

• N° campioni falsi positivi	<b>15</b>	(0.16%)
• <b>N° campioni confermati reattivi</b> (Discriminatory Test)	<b>10</b>	(0.11 %)
↓		
⇒ N° campioni HCV-RNA pos HCV-Ab pos	<b>9</b>	(0.09%)
⇒ N° campioni HIV-RNA pos HIV-Ab pos	<b>3</b>	(0.01 %)
• <b>N° campioni HCV-RNA pos HCV-Ab neg</b>	<b>0</b>	
• <b>N° campioni HIV-RNA pos HIV-Ab neg</b>	<b>0</b>	

## Conclusioni

I risultati dello studio di fattibilità hanno dimostrato che entrambe le tecnologie **TMA Chiron** e **PCR Roche** sono estremamente sensibili, specifiche, robuste e adatte allo screening dei donatori di sangue. A parità di prestazioni analitiche, la scelta della tecnologia è essenzialmente legata alla realtà operativa del Centro Trasfusionale: numero di campioni da testare, urgenza di validazione delle unità, dimensioni fisiche del laboratorio NAT, personale dedicato, organizzazione interna. L'esperienza acquisita presso i due centri che hanno partecipato allo studio consente, infatti, di fare alcune considerazioni e rilevare alcuni **punti critici**:

- il test HCV-RNA, in aggiunta allo screening di legge, può ridurre il rischio residuo da HCV, rafforza la validazione biologica delle unità trasfondibili, può confermare eventuali positività o risolvere dubbi e, non ultimo, correggere o prevenire possibili errori verificatisi durante l'esecuzione dei test immunometrici
- è applicabile razionalizzando l'esecuzione in strutture idonee
- l'esecuzione di questi test necessita di spazi adeguati organizzati preferibilmente in ambienti separati (o almeno in aree separate nello stesso ambiente) per: preparazione dei campioni, pre-amplificazione, post-amplificazione (almeno 20 m<sup>2</sup>)
- è necessario individuare almeno due operatori adeguatamente formati da dedicare esclusivamente a questa attività
- è indispensabile l'utilizzazione di strumentazione dedicata per l'esecuzione di ambedue le metodiche attualmente disponibili
- è inoltre da predisporre per entrambe le metodiche una strumentazione di back-up
- è essenziale una struttura organizzativa appropriata per la raccolta ed il trasporto dei campioni ed un supporto informatico in grado di assicurare la tracciabilità
- l'elevato costo della strumentazione e dei kit attualmente disponibili sul mercato suggerisce l'opportunità di procedere ad una centralizzazione di tali test al fine di poter garantire economia di scala, qualità, standardizzazione e il pieno utilizzo dei kit con riduzione dei costi per singolo campione

- il numero di centri da identificare per singola Regione è da considerare in funzione dei prelievi effettuati per anno.

Per quanto concerne l'**impatto sul servizio trasfusionale**, considerato che la durata dell'esecuzione del test NAT è di circa 6/8 ore, la sua introduzione in routine consente di validare i risultati entro le 12 ore dal prelievo, se i campioni sono pervenuti entro le ore 14, ed entro le 24 ore se pervenuti successivamente. In caso di esecuzione del test su mini-pool, la necessità di ripetizione di un pool positivo determina un ritardo di validazione delle unità coinvolte di circa 24 ore. Nella organizzazione dei centri interessati, entrambi dotati di un sistema centralizzato per la lavorazione e validazione biologica delle unità supportata da un adeguato sistema informatico gestionale, l'applicazione di tecniche di amplificazione genica nella routine trasfusionale non ha creato disservizi rilevanti poiché il rilascio e la distribuzione degli emocomponenti non ha subito ritardi considerevoli rispetto ai tempi tecnici necessari per l'esecuzione dei test di legge e per la lavorazione delle unità.

L'introduzione di metodiche NAT-HCV nello screening delle donazioni, utilizzando metodiche opportunamente validate, oltre a migliorare la sicurezza del sangue e dei suoi prodotti, potrebbe consentire di eliminare l'esecuzione del test HCV-RNA sui pool di plasma destinati alla lavorazione da parte delle industrie produttrici di plasmaderivati, poiché il prodotto di partenza risulterebbe già testato, con conseguente riduzione dei costi di produzione dei plasmaderivati.

## Bibliografia

1. ROGERS, PM, SALDANHA, J, ALLAIN JP. Report of EPFA/NIBSC Workshop "Nucleic Acid Amplification Tests (NAT) for the detection of blood-borne viruses" Held on 31 October 1996 in Amsterdam, The Netherlands. *Vox Sang* 1997,72:199-206.
2. YERLY S, PEDROCCHI M, PERRIN L. The use of polymerase chain reaction in plasma pools for the concomitant detection of hepatitis C virus and HIV type 1 RNA. *Transfusion* 1998,38:908-914.
3. FLANAGAN P, SNAPE T. Nucleic acid technology (NAT) testing and the transfusion service: a rationale for the implementation of minipool testing *Transfusion Med* 1998,8:9-14.
4. LEFRÈRE, JJ, COSTE, J, DEFER, C. ET AL. Screening blood donation for viral genomes: multicenter study of real time simulation using pooled samples on the model of hepatitis C virus RNA detection. *Transfusion*, 1998,38:915-923.
5. REESINK, HW, ENGELFRIET, CP. Consequences of Nucleic acid amplification testing for blood transfusion centres. *Vox Sang*, 1998,74:263-270.
6. NUBLING, CM, SEITZ, R, LOWER, J. Application of Nucleic Acid Amplification Techniques for Blood Donation Screening. *Transfus Med*, 1998,25:86-90.
7. LEE, HH, ALLAIN, JP. Genomic screening for blood-borne viruses in Transfusion settings. *Vox Sang*, 1998,74:119-123.
8. ROTH, WK, WEBER, M, SEIFRIED, E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting. *Lancet*, 1999,353:359-362.
9. MULLER-BREITKREUTZ, K, BAYLIS, SA, ALLAIN, JP. Nucleic Acid Amplification tests for the detection of blood-borne viruses. *Vox Sang*, 1999,76:194-200.
10. FLANAGAN, P, BARBARA, J. PCR testing of plasma pools: from concept to reality. *Transfusion Medicine Reviews*, 1999,13:164-172.
11. BARIN, F. Routine PCR screening of blood. *Lancet*, 1999,353,1799-1800.

12. PETRIK, J, HEWITT, P, BARBARA, J, ALLAIN, JP. Large-Scale HCV-RNA screening in first-time blood donors: the first step towards genomic screening of blood donation. *Vox Sang*, 1999,76: 159-162.
13. SALDANHA, J, HEATH, A, LELIE, N, PISANI, G, NUBLING, M, YU, M. AND THE COLLABORATIVE STUDY GROUP, The calibration in International Units (IU)/ml of five HCV RNA reference reagents against the WHO International Standard 96/790 is described. *Vox Sang* 2000,78 (4):217-224.
14. PISANI, G, MELE, C, BISSO, G, WIRZ, M, e GENTILI, G. Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) for the detection of Hepatitis C Virus (HCV) in plasma pools. Validation Report. *Rapporti Istisan*, 2000,6:1-11.

## **CONTROLLO DI QUALITÀ' DEI SAGGI DI AMPLIFICAZIONE GENICA NEI LABORATORI DIAGNOSTICI**

Sebastiano Di Biase (a), Maurizia Brunetto (b), Donato Labella (a), Nicolò Di Pietro (a), Vittorio Salotti (a), Ugo Baicchi (c), Piero Palla (c) e Ferruccio Bonino (b). “Gruppo di Studio Italiano per il Controllo di Qualità sull'applicazione delle tecniche di Biologia Molecolare per la sicurezza del sangue e degli emoderivati” (d).

(a) *GeneDia s.r.l. Laboratorio Ricerca e Sviluppo, Napoli*

(b) *Unità Operativa di Gastroenterologia ed Epatologia, Spedali Riuniti di Santa Chiara, Pisa.*

(c) *Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Spedali Riuniti di Santa Chiara, Pisa.*

(d) *Benucci (Ortho); Vicari, Scudeller (SIMT – BG); Sirchia, Della Torre (SIMT – MI); Miceli, Iudicone (CRI C.N.T.S. – ROMA); Rinaldi, Gentile (ASL Caserta/I – Servizio Centralizzato di Biologia Molecolare); Monguzzi (SIMT – Sesto S. Giovanni MI); Rapicetta (Lab. Virologia –ISS ROMA); Cambiè (SIMT- LODI); De Biase, Quartaroli (Lab. Analisi Osp. C. Poma – MN); Massaro (AVIS – TO); Borrini, Colalillo (Trasf. Militare – La Spezia); Utech, Macrì (SIMT Osp. Cardarelli - NA); Rigolin, Guerra (Lab. Analisi Arcispedale S. Anna – FE); Raffaele (SIMT – LE); Vaselli (SIMT- PD); Gessoni (SIMT – MESTRE); Colucci (Roche – BASILEA), Massaro (AVIS TO).*

### **Introduzione**

Nel corso dell'ultimo decennio abbiamo assistito ad una larga diffusione delle tecniche di Biologia Molecolare per scopi di ricerca e ad una forte spinta all'introduzione di queste tecniche nella diagnostica clinica. Ciò è avvenuto grazie all'impiego di una tecnica di grande versatilità ed affidabilità che consente l'amplificazione degli acidi nucleici, la “Polimerase Chain Reaction” (PCR). Questa tecnica permette di generare un numero elevato di copie di un frammento di DNA o cDNA partendo da quantità ridotte di estratti di acidi nucleici (DNA o RNA). Il processo consistente in un sostanziale arricchimento del numero di copie del target selezionato, ci permette di sottoporre il campione in esame ad ulteriori fasi analitiche che ne consentono l'identificazione, la caratterizzazione e, in particolari condizioni di esecuzione della reazione stessa, la misura quantitativa. La PCR, infatti, svolge tradizionalmente due funzioni: quella analitica, che consiste nella definizione della presenza/assenza di determinate sequenze geniche nel campione in esame (come nel caso dell'identificazione di genomi virali, per es. HCV, HIV etc...) e quella preparativa, nella quale il campione amplificato serve come bersaglio per l'applicazione di ulteriori tecniche di biologia molecolare come la definizione della sequenza nucleotidica, il

clonaggio, l'ibridazione, il taglio con enzimi di restrizione etc. La diffusione raggiunta dalle tecniche di Biologia Molecolare nel laboratorio clinico è veramente lusinghiera già allo stato attuale, per le applicazioni in virologia ed in genetica, ma se ne prospetta un sicuro incremento quando le stesse tecniche saranno più chiaramente applicabili in altre discipline cliniche come: oncologia, ematologia, medicina forense, chimica clinica, tipizzazione tissutale, etc. All'introduzione della PCR ha contribuito anche la disponibilità commerciale di numerosi reagenti e kit utilizzabili per le varie fasi analitiche, che vanno dall'estrazione degli acidi nucleici, alla retrotrascrizione dell'RNA in cDNA, all'allestimento dei protocolli di PCR con reagenti premiscelati, fino alle varie possibili fasi di rivelazione post-PCR.

Anche la strumentazione in uso è molto progredita, sono infatti oggi disponibili termociclatori in grado di garantire grande omogeneità ed accuratezza di temperatura, oltre che velocità di esecuzione dei cicli. In alcuni casi si assiste anche a tentativi di completa automazione del sistema, con la disponibilità dei primi sistemi di estrazione automatici, che riducono l'intervento dell'operatore con la diminuzione soprattutto dei rischi di contaminazione. Va comunque detto che, nonostante il sostenuto ritmo di crescita che caratterizza l'introduzione delle applicazioni di Biologia Molecolare, la PCR e le tecniche ad essa correlate possono considerarsi ancora in una fase "artigianale" in cui l'esperienza e il bagaglio tecnico dell'operatore, i fattori intrinseci correlati alla matrice del campione ed ai materiali utilizzati per l'esecuzione delle reazioni ed una serie di fattori, purtroppo imprevedibili e non quantificabili, possono seriamente interferire sulla resa e sulla specificità della tecnica. Queste ed altre più ovvie considerazioni inducono la necessità dell'introduzione anche nel laboratorio di Biologia Molecolare, di controlli di qualità interni e, laddove possibile, esterni al laboratorio, come del resto per qualsiasi settore di indagine che riguardi una diagnostica di laboratorio.

Gli strumenti per allestire un controllo di qualità interno sono a disposizione di ogni laboratorio di Biologia Molecolare che ne voglia far uso, ovvero l'inserimento di controlli negativi e positivi nelle fasi di retrotrascrizione ed amplificazione, l'adozione di semplici metodi di misura degli acidi nucleici, laddove possibile, per il controllo della fase di estrazione, l'introduzione di un decalogo di comportamenti degli operatori che riduca al minimo il rischio di contaminazione, che risulta ancora oggi uno dei maggiori problemi di un laboratorio di PCR. Tuttavia uno degli ostacoli maggiori alla riproducibilità dei sistemi di biologia molecolare è rappresentato dai reagenti coinvolti nella reazione, dal loro stato di conservazione e dal modo in cui questi vengono utilizzati, che determina un'elevata variabilità nell'efficienza del sistema. Poiché l'obiettivo più difficile da raggiungere, soprattutto per scopi diagnostici, è quello di fornire risultati inter - laboratorio omogenei e confrontabili tra loro, diventa indispensabile poter disporre di un reagente di riferimento che sia in grado di produrre una piattaforma comune a cui riportarsi, che possa costituire il "metro" comune per l'espressione dei risultati. Tutto ciò si riporta alla verifica esterna di qualità, che rappresenta l'unico sistema per la produzione di reagenti e controlli adeguati che rispondano a tali esigenze. Viene riportato di seguito un esempio di impostazione,

organizzazione, preparazione e distribuzione di un controllo di qualità legato alla determinazione di HCV-RNA in campioni biologici.

### **(QCHCV.1) Un esempio di Verifica esterna di qualità**

Purtroppo l'avvio di una verifica esterna di qualità per le tecniche di Biologia Molecolare, è complicata dal fatto che tali controlli possono essere limitati a pochi casi di riconosciuto valore clinico e soprattutto ad applicazioni che godano di una adeguata diffusione. Per questo e, soprattutto per il grande interesse che le tecniche di Biologia Molecolare stanno riscontrando nei Servizi di Medicina Immunotrasfusionale, l'idea di organizzare una verifica esterna di qualità per le tecniche di biologia molecolare applicate alla diagnostica, è stata da noi indirizzata verso l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare per la sicurezza del sangue e degli emoderivati.

Il rischio di trasmissione virale (HIV, HBV, HCV) associato alle trasfusioni di sangue, è stato negli ultimi anni notevolmente ridotto, grazie alla attenta selezione dei donatori, allo screening dei marcatori virali (sia l'antigene che l'anticorpo) ed all'uso di procedure di inattivazione virale introdotte durante la preparazione dei derivati del sangue. Tuttavia, nonostante l'adozione ormai universale di queste misure, ancora oggi sono descritte infezioni virali come conseguenza della somministrazione di sangue e dei suoi derivati. Queste infezioni occasionali sono probabilmente da attribuire a donazioni avvenute durante il periodo "finestra", che rappresenta la fase precoce dell'infezione durante la quale i test convenzionali di screening, come la ricerca di anticorpi, risultano ancora negativi, oppure come recentemente dimostrato da Farci et al, è da considerare il fallimento della risposta immunitaria dovuta all'incremento della diversità virale nella regione ipervariabile E2 del capsido virale. Durante questo periodo i livelli di Virus circolante possono essere molto elevati e pertanto di facile riconoscimento mediante l'uso di tecniche di identificazione degli acidi nucleici (NAT) (Tabella 1).

**Tabella 1-** *Vantaggi offerti dall'introduzione dei test NAT*

<b>Tipo di virus</b>	<b>Periodo Finestra</b>	<b>Stima della riduzione del periodo finestra con l'introduzione dei NAT</b>
HCV	82 gg	59 gg
HBV	56 gg	25 gg
HIV	22 gg	12 gg

Il maggior beneficio che si può trarre dall'introduzione dei test NAT è rappresentato, quindi, dalla riduzione del periodo finestra relativo all'HCV. Inoltre, le NAT in uso per la ricerca di HCV sono certamente quelle più all'avanguardia in questo momento, oltre che quelle più comunemente già utilizzate in molti Centri Trasfusionali. Già dal 1995 infatti, numerosi gruppi di lavoro si sono attivati per la standardizzazione delle tecniche di amplificazione genomica sul sangue e sui suoi derivati.

Utilizzando i test NAT non sempre è possibile ottenere il massimo della sensibilità, mentre è facile ottenere risultati di falsa positività a causa delle problematiche di contaminazione in cui si può cadere, se non vengono adottate adeguate misure preventive. Prima che i dosaggi NAT possano essere utilizzati su base routinaria per lo screening dell'HCV-RNA, le metodologie necessitano di una fase di standardizzazione. La sensibilità e la specificità dei dosaggi può variare tra diversi laboratori. Questa variabilità è stata ben illustrata dai primi due studi internazionali collaborativi condotti in Europa, da cui appare che solo il 16% dei laboratori ha fornito risultati privi di errori (Tabella 2). Circa un terzo dei partecipanti ha avuto seri problemi nella corretta rivelazione dell'HCV-RNA.

**Tabella 2** – Risultati ottenuti con i due studi europei Eurohep I e II

Studio condotto	Risultati corretti	Errore sulle basse viremie	Errori di falsa positività
Eurohep I (31 laboratori)	5 laboratori (16%)	7 laboratori (23%)	19 laboratori (61%)
Eurohep II (86 laboratori 136 set di dati)	22 set dati (16%)	39 set dati (29%)	75 set dati (55%)

La standardizzazione dei test NAT può essere raggiunta solo mediante l'utilizzo di reagenti di riferimento comunemente accettati in tutti i dosaggi. Allo scopo sono stati preparati pannelli di campioni di plasma a diverse viremie, ottenuti per diluizione seriale di un unico campione di soggetto HCV-RNA positivo HCV-Ab negativo. I partecipanti sono i Servizi di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Produttori di derivati del sangue e Produttori di Kit utilizzati per diagnostica. Un reagente di riferimento sarà poi preparato, basandosi sui risultati di un tale studio, equivalente alla più alta diluizione del campione rivelata da tutti i partecipanti allo studio collaborativo. Lo standard potrà essere poi incluso in ogni seduta di lavoro al fine di validarne i risultati ottenuti.

### Preparazione dei pannelli di controllo qualità

La preparazione dei pannelli di campioni oggetto dello studio, è stata eseguita secondo il seguente schema: su 4 unità di plasma provenienti da 4 donatori diversi, viene eseguita la ricerca anticorpi anti-HCV ed Anti-HIV, la ricerca di HBsAg ed il dosaggio di ALT/AST. I campioni vengono inoltre sottoposti alla ricerca qualitativa di HCV-RNA ed HIV-RNA. Tutti i dosaggi sono risultati negativi, e in particolare per l'HCV-RNA il diluente è risultato NEGATIVO con un sistema di RT-PCR applicato in grado di rivelare 95% di positività con un cut-off di 200 genomi/ml di HCV-RNA (corrispondenti a 50 U.I. calcolate con il nostro fattore di conversione pari a 4 genomi = 1 U.I.).

Un campione di siero appartenente ad un soggetto non reattivo per HBsAg e anti HIV, anti-HCV negativo e positivo per HCV-RNA con viremia pari a  $3,1 \times 10^6$  genomi/ml e genotipo 1b, viene utilizzato per produrre i campioni a diversa concentrazione di HCV-RNA. La viremia è stata determinata mediante RT-PCR di diluizioni successive del campione, confrontate con lo standard di riferimento Accurun 305, prodotto dalla Boston Biomedica, la procedura è stata ripetuta dieci volte. Sullo stesso campione sono state eseguite 5 determinazioni di viremia con il metodo branched DNA (Quantiplex HCV ver. 2.0- Chiron). La media dei valori ottenuti esprime la viremia sopra riportata. Il campione è stato diluito successivamente, per produrre le concentrazioni riportate in Tabella 3.

**Tabella 3** - *Titolo teorico di HCV-RNA nei pool preparati*

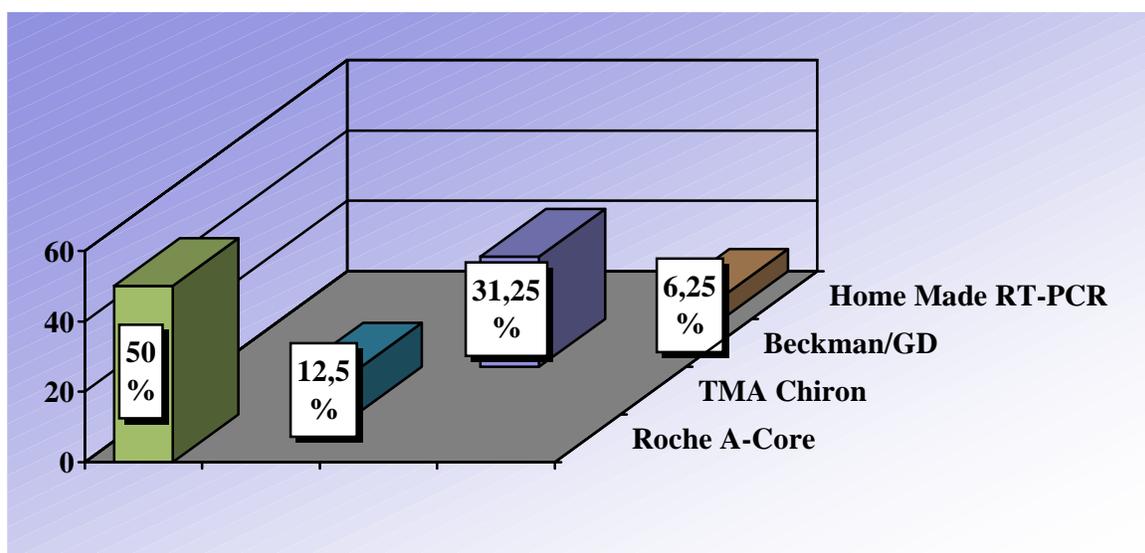
Titolo HCV-RNA	Copie/ml
Alto	$3 \times 10^5$
Medio	$3 \times 10^4$
Basso 1	$3 \times 10^3$
Basso 2	$3 \times 10^2$
Non Dosabile	3

Durante la preparazione i campioni erano tenuti in ghiaccio ed in agitazione continua. Le diluizioni sono state aliquotate in frazione da 0,5 ml, codificate e congelate a  $-80^\circ\text{C}$ .

I pannelli spediti sono stati allestiti in maniera da contenere 2 aliquote di ciascuna diluizione, accompagnate da aliquote di campioni negativi. Sono state allestite 5 serie, ciascuna composta da 6 campioni, in cui 8 campioni positivi e 22 campioni negativi erano distribuiti in maniera casuale. I pannelli predisposti sono stati spediti tramite corriere espresso in scatole di polistirolo e ghiaccio secco.

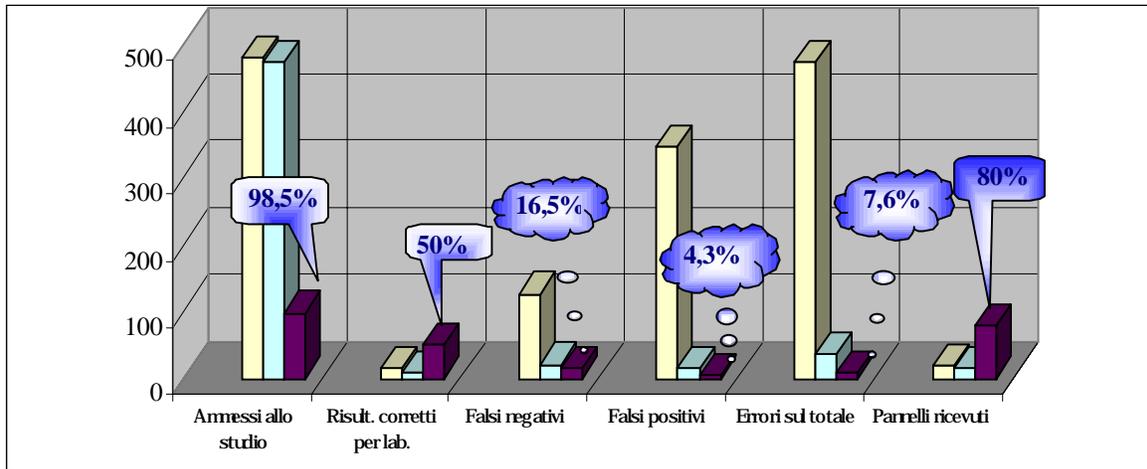
## Risultati e discussione

Lo scopo dell'iniziativa QCHCV.1 era quello di definire la sensibilità e la specificità delle metodiche di RT-PCR attualmente in uso in centri diagnostici, per la ricerca di HCV-RNA, valutare il rischio dei falsi positivi derivanti dall'applicazione delle tecniche in uso ed infine definire un reagente di riferimento di basso contenuto viremico, che risulti omogeneamente dosabile, al fine di proporre l'uso come controllo di sensibilità interlaboratorio. Di 20 pannelli spediti ed arrivati a destinazione, allo stato attuale abbiamo ricevuto 16 risposte complete, pertanto i dati sono riferiti solo al 80% del totale previsto, con la distribuzione per tipologia di test riportata in Figura 1.



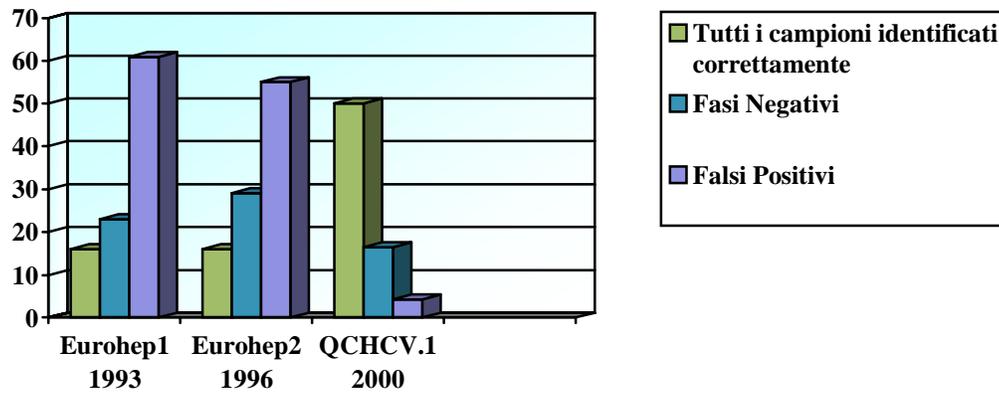
**Figura 1** - Distribuzione risposte in funzione del tipo di metodica utilizzata

La valutazione complessiva dei risultati ottenuti è chiaramente esposta nella Figura 2, dove vengono riportati, rispetto al numero di risultati complessivi accettati, i falsi negativi, i falsi positivi e gli errori complessivi commessi.



**Figura 2** – Espressione dei risultati (443 referti ammessi allo studio)

I dati riportati a confronto con i due studi comparativi condotti a livello europeo denominati Eurohep1 ed Eurohep2 mostrano un miglioramento in termini di numero complessivo di risultati corretti riscontrati (Figura 3), che dimostra un netto miglioramento della qualità dei prodotti impiegati e del loro utilizzo.



**Figura 3** - QCHCV.1 versus Eurohep1 ed Eurohep2

Tuttavia il punto cruciale sembra essere legato alla perdita delle basse viremie che è il problema più frequentemente riscontrato, mentre la bassa incidenza delle false positività indica una buona crescita del livello di apprendimento delle tecniche.

## Conclusioni

Lo studio condotto, in conclusione, dimostra che le Tecniche di Biologia Molecolare possono trovare ampio spazio nella diagnostica, sempre che siano disponibili operatori esperti e reagenti che possano dare una efficace misura delle specifiche del sistema in uso, che abbiano caratteristiche di stabilità nel tempo ed omogeneità.

Infine l'esperienza fatta per l'allestimento del QCHCV.1, sembra dare indicazioni della fattibilità oltre che della necessità, di verifiche esterne di qualità per le tecniche di Biologia Molecolare, in cui però in un futuro prossimo si riescano a valutare le capacità quantitative delle PCR e la soggettività dell'interpretazione del risultato da parte dell'operatore, magari proponendo di restituire anche parte del prodotto della reazione, per consentire la rivalutazione contemporanea di tutte le reazioni.

## Bibliografia

- ZAAIJER, H., CUYPERS, H., REESINK, H., et al. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993, 341: 722-724.
- DAMEN, M., ZAAIJER, H., REESINK, H., et al. International collaborative study on the second Eurohep HCV-RNA reference panel. *Journal of Virological Methods*, 1996, 58: 175-185.
- SCHREIBER, G.B., BUSH, M.P., KLEINMAN S.H., et al. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *New England Journal of Medicine* 1996, 334: 1685-1690.
- SALDANA, J., MINOR, P., Incidence of Hepatitis C virus RNA in anti-HCV-negative plasma pools and blood products. *Vox Sanguinis* 1996, 70: 232-234.
- NEUMAIER, M., BRAUN, A., and WAGENER, C., Fundamentals of quality assesment of meolecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clinical Chemistry* 1998, 44:1, 12-26.
- SALDANA, J. Standardization, Quantification and Quality Control of Assays for HCV-RNA. *Viral Hepatitis* 1999, 5 (1): 1-11.
- ORLANDO, C., CASINI RAGGI, C., PAZZAGLI, M., Un programma di valutazione esterna della qualità per l'analisi del DNA tramite amplificazione con PCR. *Biochimica Clinica* 2000, 24:2, 96-104.
- FARCI, P., SHIMODA, A., COIANA, A., DIAZ, G., PEDDIS, G., et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000, 288: 5464, 339-344.

## **IMMUNITA' E PATOGENESI**

Vincenzo Barnaba, Patrizia Pontisso

## **PROSPETTIVE PER UN VACCINO PER L'EPATITE C**

Sergio Abrignani

*Centro Ricerche IRIS, Chiron, Siena*

Nonostante l'incidenza dell'epatite C (HCV) sia notevolmente diminuita, un vaccino efficace contro l'HCV apporterebbe dei benefici considerevoli alla sanità pubblica. Infatti, se si considera l'alto tasso di infezioni croniche a seguito dell'infezione acuta da HCV e l'efficacia limitata delle terapie attualmente disponibili, la prevenzione di nuove infezioni rimane la strategia più conveniente per il controllo della malattia. A livello mondiale sono stati stimati circa 200 milioni di portatori cronici asintomatici, i quali rappresentano una notevole fonte di infezione. Alcune vie di trasmissione, come l'uso di droghe iniettabili, continueranno a rappresentare un notevole rischio di trasmissione nel prossimo futuro.

Un vaccino efficace contro l'HCV apporterebbe un potenziale beneficio a tutti coloro che rischiano il contatto con sangue infetto, quali operatori sanitari, pazienti sottoposti a emodialisi o trattati con emoderivati. Non bisogna trascurare inoltre che un vaccino contro l'HCV potrebbe essere ampiamente somministrato agli adolescenti considerati a rischio per l'uso di droghe. Nonostante il rischio di trasmissione per via sessuale sia basso, sarebbe raccomandabile la vaccinazione ai partners di persone infette. Infine, un vaccino efficace e sicuro contro l'HCV potrebbe essere raccomandato per un uso più generalizzato.

### **Da cosa dovrebbe proteggere un vaccino contro l'HCV?**

Un vaccino contro l'HCV dovrebbe essere in grado di prevenire l'infezione o la cronicizzazione della stessa a seguito dell'infezione acuta. Un vaccino ideale dovrebbe ovviamente proteggere dall'infezione, dovrebbe cioè indurre un'immunità sterilizzante. In realtà, questa è una meta alquanto ambiziosa e potrebbe persino non risultare necessaria.

Infatti, sono le manifestazioni dell'infezione cronica da HCV che portano alla malattia evidente a livello clinico, mentre la vasta maggioranza delle infezioni acute sono asintomatiche e prive di conseguenze cliniche. Di conseguenza, un vaccino che permetta solo "un'infezione transitoria" (subclinica o di acutezza limitata) prevenendo lo sviluppo dell'infezione cronica da HCV potrebbe essere tanto efficace quanto un vaccino che induca l'immunità sterilizzante.

Un altro requisito essenziale per un vaccino contro l'HCV è che protegga contro l'infezione da parte dei maggiori genotipi di HCV. Un vaccino che dimostri una limitata efficacia genotipo-specifica potrebbe necessitare di restrizioni geografico-specifiche per il suo utilizzo e sarebbe difficilmente utilizzabile all'atto pratico.

### **Quali difficoltà bisogna superare per lo sviluppo di un vaccino contro l'HCV?**

Per delineare i problemi relativi allo sviluppo di un vaccino contro l'HCV, è interessante paragonare quanto ci sia di simile e diverso nello sviluppo di un vaccino contro l'HIV. Entrambe le infezioni, da HCV e HIV, mostrano una tendenza alla cronicizzazione; comunque, mentre non è mai stata documentata la risoluzione dell'infezione da HIV, circa il 25% delle infezioni da HCV si risolvono spontaneamente, presumibilmente grazie all'induzione di meccanismi di difesa immunitaria dell'ospite in grado di eliminare l'infezione. Potrebbe quindi risultare più semplice proteggere contro l'HCV se si potessero stimolare le stesse risposte immunitarie che, nei casi di infezione naturale, portano all'eliminazione dell'infezione. Entrambi i virus mostrano una marcata eterogeneità genetica e fenotipica con regioni relativamente conservate e regioni ipervariabili. Ad oggi, la nostra limitata conoscenza dei correlati di protezione contro l'infezione da HCV e da HIV è una delle maggiori sfide nello sviluppo di vaccini per queste malattie. In ogni caso, un vaccino contro l'HCV non deve superare gli ulteriori ostacoli cui devono far fronte i ricercatori di un vaccino contro l'HIV. La trasmissione mucosale dovuta all'attività sessuale è predominante nell'infezione da HIV ma è poco frequente nell'infezione da HCV, in cui la trasmissione è prevalentemente parenterale. A differenza dell'HIV, l'HCV non esiste in uno stato provirale integrato latente. Infine, in base alle nostre conoscenze, l'HCV non inibisce la risposta immunitaria dell'ospite nel corso dell'infezione, come avviene nel caso dell'infezione da HIV.

Di contro, lo sviluppo di un vaccino contro l'HCV deve far fronte a vari problemi dovuti alla peculiarità dell'HCV. In primo luogo, l'HCV è un virus che può essere rilevato solo come RNA tramite PCR. Infine, il virus non si replica efficientemente *in vitro*, quindi le conoscenze sulla particella virale di HCV sono molto limitate.

### **Lo sviluppo di un vaccino dal punto di vista del sistema immunitario**

Un vaccino ideale contro l'HCV dovrebbe indurre anticorpi cross-neutralizzanti anti-involucro e fornire nello stesso tempo sia una forte risposta helper proinfiammatoria HCV-specifica dei linfociti T CD4<sup>+</sup>, sia una risposta citotossica dei linfociti T CD8<sup>+</sup> HCV-specifici. Le informazioni ottenute dallo studio dell'infezione naturale possono fornire degli indizi circa la natura e l'importanza di queste componenti della risposta immunitaria per il miglioramento o l'eliminazione dell'infezione da HCV.

E' difficile valutare le risposte anticorpali neutralizzanti perché il virus non cresce *in vitro*. Basandosi sul presupposto che una fase essenziale del ciclo vitale del virus deve comprendere il legame dell'HCV a qualche recettore cellulare, abbiamo sviluppato un saggio citofluorimetrico al fine di valutare la capacità di un siero di inibire il legame della glicoproteina E2 dell'involucro dell'HCV alle cellule umane (saggio NOB). Abbiamo scoperto che la glicoproteina HCV E2 ricombinante espressa nelle cellule di mammiferi, si lega alle cellule umane con alta affinità. Di recente, abbiamo scoperto che

il sito di binding di E2 è il CD81 e si è anche dimostrato che il CD81 è in grado di legare particelle virali. Utilizzando la proteina ricombinante E2, sono stati determinati i livelli di anticorpi NOB nel siero di pazienti infettati da vari genotipi di HCV. Nei malati cronici di epatite C i titoli anticorpali anti-gpE2 (saggio NOB) sono bassi o assenti (circa il 50% dei casi) a prescindere dal genotipo di HCV che ha provocato l'infezione. Titoli superiori all'1/1000 vengono visti occasionalmente nel 15% circa dei pazienti cronici ma di solito non durano nel tempo. Uno studio recente ha suggerito che, tra i rari casi di risoluzione naturale dell'epatite C, si rilevano spesso titoli NOB molto alti e per periodi di tempo prolungati.

Dati rilevanti circa il ruolo degli anticorpi anti-HCV nella prevenzione dell'infezione provengono da studi di protezione passiva. Vari studi eseguiti con preparazioni di immunoglobuline umane derivate da diversi gruppi di donatori di plasma hanno indicato un certo grado di efficacia nella prevenzione della trasmissione dell'HCV acuta o cronica in campo trasfusionale. Più di recente sono state fatte osservazioni analoghe nel campo dei trapianti di fegato, e in relazione alla trasmissione sessuale. Ulteriori prove indirette che gli anticorpi anti-HCV possono essere in grado di neutralizzare l'HCV derivano dall'osservazione che le preparazioni commerciali di Ig che escludevano i donatori anti-HCV positivi inaspettatamente hanno causato l'infezione tra coloro che le ricevevano, al contrario delle preparazioni di Ig non controllate. Nel loro insieme, questi dati suggeriscono che gli anticorpi anti-HCV possono essere protettivi, almeno quando somministrati sotto forma di immunoglobuline policlonali preparate da più donatori infettati da diversi genotipi e quasi-specie di HCV.

Le cellule T, CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, riconoscono gli antigeni come peptidi legati rispettivamente alle molecole di classe II e classe I del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) sulla superficie di una cellula presentante l'antigene (APC). Di solito, la risposta delle cellule T CD4<sup>+</sup> alle proteine virali è essenziale per la protezione poiché queste cellule sono necessarie sia per la produzione di anticorpi da parte delle cellule B, sia per l'attivazione ed espansione delle cellule T CD8<sup>+</sup>.

Determinando la risposta proliferativa HCV-specifica delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) *in vitro* si è dimostrato che la maggioranza degli individui infettati dal virus dell'HCV mostrano risposte delle cellule T CD4<sup>+</sup> alle proteine virali. Quando la proliferazione delle cellule T è correlata alla fase clinica di infezione, c'è una tendenza che indica che gli individui sieropositivi sani rispondono alle proteine dell'HCV in modo più pronunciato dei pazienti affetti da epatite cronica. Inoltre, esiste una correlazione tra la presenza di una risposta delle cellule T alla proteina Core dell'HCV e lo stato di portatore sano, il che indica che una risposta più consistente delle cellule T alle proteine dell'HCV è associata a un decorso benigno dell'infezione. Tale risposta comunque non coincide con l'eliminazione del virus. Inoltre, è stato dimostrato che la soluzione di un'infezione acuta correlata con una forte risposta delle cellule T CD4<sup>+</sup> alle proteine non strutturali dell'HCV, indicando quindi un ruolo per questo tipo di risposta nell'eliminazione dell'infezione acuta da HCV. In base a questi dati, le cellule T CD4<sup>+</sup> potrebbero svolgere un ruolo importante sia nell'eliminazione dell'infezione acuta, sia nel mantenere l'infezione sotto il controllo

del sistema immunitario. Si potrebbe ipotizzare che la risposta delle cellule T CD4<sup>+</sup> alle proteine dell'HCV fornisca un aiuto essenziale alle cellule B e alle cellule T CD8<sup>+</sup> per mantenere il livello delle risposte umorali e cellulari sufficiente a proteggere dalla malattia.

E' probabile che le risposte delle cellule T citotossiche svolgano un ruolo importante nel determinare l'evoluzione dell'infezione da HCV. Le risposte citotossiche classe I ristrette sono uno dei principali meccanismi di difesa dalle infezioni virali. La risposta CTL nell'HCV potrebbe contribuire all'eliminazione del virus, come anche al danneggiamento delle cellule epatiche.

### **Valutazione dei vaccini contro l'HCV nei modelli animali**

Lo scimpanzé è l'unico animale che può essere infettato dall'HCV. Come nell'uomo, l'infezione negli scimpanzé è primariamente epatotropa, con una lieve epatite acuta che si sviluppa dopo l'infezione. Anche la cinetica della viremia a seguito dell'infezione acuta è simile a quella nell'uomo. Anche gli scimpanzé possono sviluppare l'infezione cronica con viremia persistente. Comunque, una differenza rilevante tra l'infezione nello scimpanzé e nell'uomo risiede nel fatto che l'infezione cronica di solito non provoca un quadro istologico di epatite acuta, poiché gli scimpanzé sembrano essere predisposti alla viremia persistente cronica in assenza di un'epatite significativa.

Sono stati eseguiti studi di infezione negli scimpanzé vaccinati con glicoproteine ricombinanti (E1 e E2) dell'involucro dell'HCV. In uno studio iniziale, sette scimpanzé sono stati vaccinati tre volte con proteine E1/E2 ricombinanti, e 3 settimane dopo l'ultima immunizzazione gli animali sono stati inoculati per via endovenosa con 10 dosi infettanti (CID50) di virus omologo. I cinque animali che hanno risposto con i titoli più alti di anticorpi anti-E1/E2, misurati con ELISA ed il saggio NOB, erano tutti completamente protetti dall'infezione con nessuna evidenza di infezione virale in nessun momento, anche a seguito dell'utilizzo di saggi di RT-PCR per l'RNA virale. Ciò suggerisce l'ottenimento di immunità sterilizzante, probabilmente tramite l'induzione di alti livelli di anticorpi neutralizzanti. I due animali che hanno avuto una risposta più bassa hanno manifestato un'infezione acuta, senza però sviluppare la malattia cronica. Di contro, tutti e quattro i controlli non vaccinati hanno sviluppato l'infezione cronica a seguito dell'inoculo virale.

Al fine di valutare se si possono generare risposte cross-neutralizzanti, abbiamo immunizzato dieci scimpanzé con la proteina E1/E2 ed abbiamo infettato con HCV del ceppo eterologo HCV-H. Nonostante l'infezione si sia manifestata in tutti gli animali, c'erano chiari segni di un miglioramento dell'epatite acuta e nove su dieci vaccinati non hanno sviluppato l'infezione cronica. I dati, derivanti dallo studio di questo prototipo di vaccino ricombinante gpE1/gpE2, sono incoraggianti per lo sviluppo clinico di un vaccino per la prevenzione dell'infezione cronica.

## **Sfide nella valutazione dell'efficacia di un possibile vaccino contro l'HCV**

Nonostante il modello di infezione nello scimpanzé sia utile come prima guida per la determinazione ed il controllo di potenziali vaccini, la prova definitiva per stabilire se un vaccino profilattico contro l'HCV funziona dipende da una prova di efficacia, nei confronti di un placebo, in una popolazione ad alto rischio.

Lo sviluppo clinico di un possibile vaccino contro l'HCV inizia dalla valutazione della sicurezza e tollerabilità in piccoli studi di fase 1 in adulti sani non infettati. Informazioni preliminari sull'immunogenicità possono inoltre essere ottenute e paragonate con i dati raccolti negli studi preclinici. Se il vaccino è clinicamente ben tollerato e stimola delle risposte immunitarie accettabili, si dà inizio alla fase 2 nel corso della quale si ottimizzano le dosi e la schedula del vaccino al fine di caratterizzare le risposte prima di dare inizio alle prove di efficacia in fase 3.

Se il vaccino contro l'HCV candidato da prova di efficacia nel corso degli studi preclinici in modelli di primati, e di un buon livello di sicurezza e una robusta azione immunogenica nel corso delle prove di fase 1 e 2, uno studio dell'efficacia in fase 3 fornirà dati definitivi sull'efficacia del vaccino, ed anche una valutazione della sua efficacia relativa. Il disegno di un tale studio deve tener conto di fattori multipli e a volte contrastanti in cui le considerazioni epidemiologiche, scientifiche, virologiche e statistiche svolgono ruoli importanti.

Alcuni dei fattori chiave da non tralasciare nel disegno di uno studio sull'efficacia di un vaccino contro l'HCV sono: gli "endpoints" di efficacia, l'identificazione di una popolazione ad alto rischio e l'applicabilità dei risultati ottenuti dalla popolazione delle prove di efficacia a una popolazione più estesa in cui il vaccino sarà eventualmente utilizzato

Per determinare la possibilità che un vaccino contro l'HCV possa fornire immunità, il primo "endpoint" di uno studio di efficacia potrebbe essere la rilevazione di RNA dell'HCV nel sangue durante lo studio e alla fine dello stesso. Gli individui HCV RNA positivi potrebbero quindi essere seguiti per ulteriori 6-9 mesi per verificare in quanti di essi l'infezione viene risolta. Si giungerebbe alla conclusione che un vaccino contro l'HCV è efficace se la proporzione di soggetti positivi per HCV RNA alla fine del periodo di follow-up è significativamente inferiore nel gruppo dei vaccinati in paragone al gruppo trattato con placebo. Dati riguardanti i livelli di HCV RNA ottenuto nel corso dello studio e nel periodo di follow-up aiuterebbero a determinare se il vaccino produce immunità sterilizzante o immunità contro l'infezione cronica.

Infine, l'aspetto pratico di maggiore importanza da considerare per il disegno di uno studio di efficacia di un vaccino contro l'HCV è l'individuazione della popolazione adeguata in cui condurre lo studio stesso. Bisogna poter individuare una popolazione ad alto rischio di infezione, reclutarla e mantenerla nello studio. In principio si possono considerare un certo numero di gruppi potenzialmente ad alto rischio: utilizzatori di droghe iniettabili, emodializzati, un'intera regione o comunità in cui c'è un significativo tasso di trasmissione; operatori sanitari a rischio di accidentali punture d'ago, neonati di madri HCV positive. I fattori che influenzano la dimensione della popolazione campione richiesta in uno studio randomizzato controllato contro placebo includono: il

tasso annuo di infezione (incidenza di infezione) nella popolazione bersaglio, l'efficacia minima che si vuole ottenere, la lunghezza del periodo di immunizzazione, la lunghezza desiderata dello studio ed il tasso di soggetti che non completano lo studio. I tassi di nuove infezioni nei gruppi di popolazioni bersaglio sono un fattore critico nel determinare le dimensioni del campione necessario al disegno di uno studio che abbia sufficiente potere statistico al fine di determinare l'efficacia di un vaccino. Sfortunatamente, le stime precise sull'incidenza dell'HCV sono spesso mancanti, o soggette a schemi epidemiologici variabili, e si possono solo formulare delle ragionevoli ipotesi per generare un tasso di incidenza approssimativo ai fini della programmazione. In conclusione, la valutazione dell'efficacia clinica richiederà verosimilmente una buona parte del tempo e degli sforzi dedicati allo sviluppo di un vaccino efficace contro l'HCV.

## **RUOLO DELLE RISPOSTE T LINFOCITARIE NELLA PATOGENESI DELL'INFEZIONE DA VIRUS DELL'EPATITE C**

Carlo Ferrari, Gabriele Missale, Simona Urbani, Amelia Penna, Monica Malpeli, Carolina Boni, Albertina Cavalli, Jacopo Uggeri  
*Divisione Malattie Infettive, Azienda Ospedaliera di Parma*

L'alta tendenza dell'infezione da HCV a cronicizzare rende indispensabile lo sviluppo di vaccini preventivi e di terapie efficaci, che possano permettere la risoluzione dell'epatite in chi non riesce a controllare spontaneamente l'infezione. A tale scopo, risulta essenziale la conoscenza dei meccanismi immuno-patogenetici responsabili del danno epatico e della *clearance* virale in corso di infezione da HCV.

L'alta percentuale di cronicizzazione dell'infezione fornisce la possibilità di paragonare, fin dalle fasi più precoci di malattia, gli eventi immunologici e virologici che si manifestano nei pazienti che guariscono o che cronicizzano, rendendo quindi l'epatite acuta C un modello ideale per studiare la patogenesi della persistenza virale (1,2).

### **Risposte immunitarie cellulo-mediate in corso di infezione acuta da HCV**

Un importante contributo alle nostre conoscenze dei meccanismi coinvolti nel controllo dell'infezione da HCV e nella risoluzione della malattia epatica acuta causata da tale virus derivano da studi prospettici delle risposte immunitarie HCV-specifiche in scimpanzé sperimentalmente infettati con HCV. Gli scimpanzé, infatti, rappresentano l'unica specie animale conosciuta nella quale HCV può replicarsi e causare una malattia epatica acuta simile all'epatite C dell'uomo (3). Gli scimpanzé che riescono a risolvere spontaneamente l'infezione e a guarire dall'epatite sviluppano una risposta T linfocitaria citotossica-specifica sostenuta da linfociti a fenotipo CD8, già dimostrabile precocemente dopo l'infezione, di elevata intensità e diretta verso numerose sequenze aminoacidiche (epitopi) di HCV (3). All'opposto, gli animali in cui l'infezione evolve cronicamente mostrano risposte citotossiche significativamente più deboli, soprattutto nelle fasi molto precoci dell'infezione. L'intensa ed efficiente risposta T citotossica associata alla capacità di controllare l'infezione contrasta con una risposta anticorpale debole, evidenziabile in fase acuta di infezione in questo modello animale (3). Questi dati suggerirebbero quindi che un ruolo primario nel controllo dell'infezione da HCV sia svolto nelle fasi precoci di infezione dalle risposte T citotossiche anti-virali, piuttosto che dalle risposte anticorpali.

Come descritto per le risposte T linfocitarie citotossiche nel modello dello scimpanzé, i pazienti che riescono a guarire spontaneamente dall'epatite acuta sviluppano risposte T linfocitarie di tipo CD4 precoci e multispecifiche, come dimostrato da studi longitudinali condotti su pazienti con epatite acuta evoluti verso la guarigione o con progressione della malattia verso la cronicizzazione (1,2). Le risposte CD4-mediate non sono soltanto più intense in chi guarisce rispetto a chi cronicizza, ma risultano anche qualitativamente differenti in queste categorie di pazienti, essendo specificamente orientate in senso Th1 in chi sviluppa un'epatite acuta auto-limitata, ma più fortemente influenzate dalla produzione di citochine di tipo Th2 in chi cronicizza (4). Anche se simili studi longitudinali delle risposte citotossiche nell'epatite acuta su casistiche di pazienti di ampiezza tale da permettere di paragonare il comportamento di tali risposte in caso di guarigione o cronicizzazione non sono attualmente disponibili, i dati finora pubblicati suggeriscono che anche nell'infezione umana, come nel modello dello scimpanzé, la risoluzione dell'infezione si associa a risposte citotossiche intense, multispecifiche e persistenti (5-7)

Linfociti T HLA classe I (CD8-mediate) e classe II (CD4-mediate) ristretti continuano a circolare e ad essere dimostrabili, con le metodiche attualmente disponibili, per decenni dopo la risoluzione dell'epatite acuta, anche in assenza di apparente riesposizione al virus (8,9). Le caratteristiche delle risposte sostenute da tali linfociti indicano trattarsi presumibilmente di linfociti T effettori, piuttosto che di linfociti memoria quiescenti, continuamente ristimolati da piccole quantità di antigeni virali che persistono anche dopo la risoluzione dell'epatite. Questa osservazione suggerisce pertanto che risoluzione clinica di un'epatite acuta C non implica necessariamente eradicazione dell'infezione, ma piuttosto capacità del sistema immune di tenere sotto costante controllo piccole quantità di virus che probabilmente persistono indefinitamente nel paziente guarito.

### **Caratteristiche della risposta immunitaria cellulo-mediata nell'epatite cronica C**

Un'osservazione sorprendente è che le risposte T linfocitarie CD4-mediate risultano più intense, in quanto più facilmente dimostrabili, in un'alta percentuale di pazienti con epatite cronica C di lunga durata, rispetto a quanto si osserva nella fase acuta dell'infezione nei pazienti che successivamente sviluppano un'epatite cronica (8, 10, 11). Questo potrebbe suggerire che le risposte diventino progressivamente più intense in funzione della durata dell'infezione. Studi longitudinali di lunga durata condotti sugli stessi pazienti, dalla fase acuta fino alle fasi più avanzate di cronicizzazione, che possano confermare questa ipotesi, non sono tuttavia mai stati condotti.

Le risposte CD4-mediate sono caratteristicamente policlonali e multispecifiche in un'elevata percentuale di pazienti cronici di lunga durata, anche se in una parte di essi le risposte CD4 sono totalmente assenti a livello dei linfociti del sangue circolante. La causa dell'eterogeneità di comportamento di queste risposte in casistiche di pazienti simili per quanto riguarda attività di malattia, genotipo infettante e carica viremica resta tuttora da definire (manoscritto in preparazione).

Esiste una chiara gerarchia riguardo alla capacità stimolatoria delle diverse proteine di HCV per i linfociti CD4, in quanto core ed NS4 risultano gli antigeni più frequentemente riconosciuti, mentre le proteine dell'*envelope* virale e le proteine non-strutturali NS3 ed NS5 risultano riconosciute da una minore percentuale di pazienti. Questi dati devono tuttavia essere interpretati con cautela, poiché le proteine dell'involucro virale sono altamente variabili. A causa di questo fatto, le proteine ricombinanti usate in vitro per lo studio di tali risposte potrebbero essere state solo parzialmente appropriate, qualora le sequenze del virus infettante i singoli pazienti fossero state fortemente divergenti rispetto a quelle delle proteine usate in vitro, determinandosi in tal modo una sottostima delle risposte realmente presenti in vivo.

Anche le risposte CD8-mediate sono facilmente dimostrabili nel sangue di una elevata percentuale di soggetti con infezione cronica, utilizzando metodi di stimolazione in vitro con peptidi sintetici (12-15). La frequenza di linfociti T CD8 citotossici HCV-specifici circolanti, studiata con tetrameri HLA classe I/peptidi virali, è stata valutata nell'ordine di 0.01-1.2% di linfociti HCV-specifici rispetto al pool totale dei linfociti CD8 circolanti e il loro fenotipo è stato definito di tipo memoria (16).

Nei pazienti con infezione cronica da HCV, linfociti T CD4 e CD8 HCV-specifici sono dimostrabili all'interno del fegato, dove appaiono specificamente sequestrati, quale risultato dell'infiammazione e della cronica produzione di antigeni virali (17-23). La loro frequenza all'interno del fegato, dove l'1-2% della totalità dei linfociti T infiltranti risulta rappresentata da linfociti CD8 HCV-specifici, appare più elevata di quella osservata nel compartimento ematico (16). Pur essendo tali frequenze elevate, i dati indicano che la maggior parte delle cellule linfo-mononucleate presenti nel fegato cronicamente infiammato non sono HCV-specifiche. Nell'ambito di questi infiltrati cellulari epatici, vi è un particolare arricchimento in linfociti dell'immunità naturale, quali linfociti natural

killer, linfociti T naturali (NT) e linfociti NKT che svolgono probabilmente un ruolo importante nel mantenimento del danno epatico cronico (24, 25). Varie sequenze virali possono essere simultaneamente riconosciute dai linfociti T intraepatici nei singoli pazienti; in particolare, sequenze degli antigeni core ed NS4 sono riconosciute più frequentemente dai linfociti T CD4, a conferma dei dati ottenuti dallo studio dei linfociti T circolanti.

### **Sequenza degli eventi immunologici in corso di infezione da HCV**

I dati disponibili suggeriscono che un controllo efficace dell'infezione da HCV è strettamente dipendente dall'intensità, dalla multispecificità e dalla qualità delle risposte immunitarie cellulo-mediate precoci. In particolare, la capacità dell'individuo di sviluppare risposte T linfocitarie citotossiche nelle fasi precoci dell'infezione dirette simultaneamente contro varie sequenze virali, rappresenta probabilmente il fattore più critico per il controllo della quasispecie virale infettante. I dati suggeriscono comunque, che un controllo efficiente non può realizzarsi senza il concorso di una risposta CD4-mediata intensa e multispecifica, essenziale per rendere possibile una ottimale attivazione delle CTL e per concorrere a produrre nel sito di infezione quantità appropriate di citochine Th1 ad effetto anti-virale. In presenza di risposte cellulo-mediate multispecifiche e indirizzate in senso Th1, la possibilità di evasione del virus dalla sorveglianza immunologica e di persistenza nell'organismo infettato dovrebbe essere estremamente limitata. I risultati degli studi compiuti nel modello dello scimpanzé suggeriscono inoltre che la risposta anticorpale sia meno cruciale per il controllo iniziale dell'infezione, anche se la produzione di anticorpi neutralizzanti contribuisce certamente alla risoluzione spontanea dell'infezione (26).

Le cause primarie della differente intensità e qualità di risposte cellulo-mediate associate con la risoluzione o la cronicizzazione dell'epatite restano tuttora sconosciute, sebbene fattori correlati all'ospite e al virus siano stati indicati quali possibili responsabili di tali comportamenti differenziati. Recenti studi indicano l'associazione di HLA DRB1\*1101 e DQB1\*0301 con la risoluzione spontanea dell'infezione (27). Inoltre, è stato suggerito che dose infettante e via di introduzione del virus, oltre che l'eterogeneità dell'inoculo virale infettante possano influenzare l'esito dell'infezione.

Nella patogenesi della persistenza virale, evasione dalla risposta anticorpale e dalla risposta T linfocitaria citotossica possono certamente svolgere un ruolo importante, data l'elevata variabilità di HCV. Sebbene studi longitudinali compiuti nel campo delle infezioni da HBV e HIV abbiano stabilito che l'evasione del virus dal controllo dei linfociti T citotossici può avvenire quando le risposte siano focalizzate su poche epitopi dominanti (28-30), come dimostrato anche da studi compiuti nel modello dell'infezione da HCV nello scimpanzé (31), non esistono attualmente dati definitivi a conferma dell'importanza di questo meccanismo nella patogenesi della persistenza di HCV (32). Poiché risposte HCV-specifiche CD4- e CD8-mediate più deboli negli stadi precoci dell'infezione sono associate sia nell'uomo che nello scimpanzé con l'evoluzione cronica dell'infezione, evasione dal controllo dei linfociti T può in teoria realizzarsi più facilmente in questi pazienti, per il fatto che le risposte sono meno ampie in termini di specificità antigenica, in quanto focalizzate su un minor numero di epitopi. Ulteriori studi sono in ogni caso necessari per stabilire se le condizioni necessarie perché l'evasione virale si realizzi attraverso meccanismi mutazionali sono realmente presenti nell'infezione da HCV e se tali meccanismi rappresentino cause primarie di persistenza del virus.

Data la natura eterogenea della popolazione virale che infetta singoli individui, è possibile che HCV abbia sviluppato strategie differenziate di evasione che potrebbero agire simultaneamente interferendo con i meccanismi di difesa dell'ospite a differenti livelli. La potenziale capacità di HCV di influenzare l'effetto anti-virale dell'interferone attraverso l'interazione di E2 con PKR (33) e di interferire con i meccanismi di apoptosi indotte dal TNF attraverso il legame della proteina core con alcuni componenti della

famiglia del recettore per il TNF, rappresentano meccanismi potenzialmente coinvolti nella patogenesi del danno epatico e della persistenza virale (34-36). Inoltre, è stato suggerito che l'alta affinità di E2 per la molecola CD81 potrebbe essere un fattore interferente sull'attività di anticorpi neutralizzanti capaci di inibire il legame di HCV alla cellula ospite (37).

In virtù di quali meccanismi il virus riesca a persistere nei pazienti con epatite cronica da HCV, nonostante la presenza di CTL capaci di riconoscere varie sequenze virali e di espandersi ed esprimere funzione effettrice in vitro a seguito del riconoscimento dell'antigene, resta tuttora un quesito irrisolto. A tale proposito, non si può al momento attuale escludere che gli studi in vitro diano una stima in eccesso dell'intensità e dell'ampiezza delle risposte T linfocitarie nei pazienti con malattia cronica. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che la progressiva evoluzione della quasispecie virale nel corso dell'infezione, con continua emergenza di nuove mutazioni, comporterebbe l'attivazione sequenziale di nuove popolazioni linfocitarie capaci di riconoscere le nuove sequenze virali emerse nel corso del tempo. Questo potrebbe quindi condurre ad una espansione progressiva del repertorio di linfociti T HCV-specifici presenti nell'organismo infettato. Nella dinamica di questi eventi, linfociti memoria persisterebbero nell'organismo e si espanderebbero in vitro a seguito di stimolo antigenico appropriato, anche se la sequenza virale riconosciuta non è più presente in vivo nella popolazione virale infettante, in quanto modificata da mutazioni emerse nel tempo. Anche se capaci di esprimere funzione effettrice in vitro, queste popolazioni sarebbero inefficienti in vivo a causa dell'assenza nell'organismo infettato della sequenza virale bersaglio della loro attività citotossica specifica.

Infine, la recente scoperta che HCV può legare la molecola CD81 ha importanti implicazioni patogenetiche (38). Infatti, segnali costimolatori possono essere trasmessi ai linfociti B (e probabilmente anche ad altre popolazioni linfocitarie) a seguito del legame alla molecola CD81, che è un componente del complesso molecolare CD21/CD19, coinvolto nell'attivazione B linfocitaria (39). Il legame di HCV a questo complesso molecolare ridurrebbe la soglia di attivazione dei linfociti B (40), facilitando in questo modo la produzione di autoanticorpi, in modo paragonabile a quanto osservato per EBV che è stato dimostrato legarsi a CD21 (41). Questo può spiegare il motivo per cui manifestazioni extraepatiche causate da reazioni autoimmunitarie con presenza di autoanticorpi sono frequentemente associate all'infezione da HCV. Inoltre, segnali costimolatori rilasciati a seguito dell'interazione E2/CD81 potrebbero anche contribuire all'attivazione e all'espansione di popolazioni cellulari non-virus specifiche all'interno del fegato infettato, determinando una diluizione dei linfociti T HCV-specifici in tale sede, con conseguente interferenza con l'espressione delle loro funzioni effettrici anti-virali.

## Bibliografia

1. MISSALE, G, BERTONI, R, LAMONACA, V, ET AL. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest.*, 1996 Aug 1;98(3):706-14.
2. DIEPOLDER, HM, ZACHOVAL, R., HOFFMANN, RM., ET AL. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet*, 1995 Oct 14;346(8981):1006-7.
3. COOPER, S, ERIKSON, AL, ADAMS, EJ ET AL. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*, 1999; 10: 439-449
4. TSAI, SL, LIAW, YF, CHEN, MH, ET AL. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology*, 1997;25: 449-458.
5. LECHNER, F., WONG, D.K.H., DINBAR, P.R., ET AL. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J.Exp.Med.* 2000;191:1499-1512.
6. LECHNER, F., GRUENER, N.H., URBANI, S., ET AL. CD8+ T cell responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur.J.Immunol.* 2000;30:2479-2487.

7. GRUNER, N.H., GERLACH, T.J., JUNG, M.-C., ET AL. Association of hepatitis C virus-specific CD8+T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J. Infect. Dis.* 2000;181:1528-1536.
8. FERRARI, C, VALLI, A, GALATI, L, ET AL. T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infections. *Hepatology*, 1994;19: 286-295.
9. TAKAKI, A, WIESE, M, MAERTENS, G, ET AL. Cellular, immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nature Medicine* 2000;6:578-582.
10. BOTARELLI, P, BRUNETTO, MR, MINUTELLO, MA ET AL T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology*, 1993;104: 580-587.
11. HOFFMANN, RM, DIEPOLDER, HM, ZACHOVAL, R, ET AL. Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocytes epitope of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology*, 1995;21:632-636.
12. BATTEGAY, M, FIKES, J, DI BISCIEGLIE, AM, ET AL. Patients with chronic hepatitis C have circulating cytotoxic T cells which recognize hepatitis C virus encoded peptides binding to HLA-A2.1 molecule. *J. Virol*, 1995;69: 2462-2470.
13. CHERNY, A, MC HUTCHISON, JG, PASQUINELLI, C, ET AL. Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus derived peptides containing the HLA-A2.1 binding motif. *J. Clin. Invest.* 1995;95: 521-530.
14. SHIRAI, M, ARICHI, T, NISHIOKA, M, ET AL. CTL Responses of HLA-A2.1-transgenic mice specific for Hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of humans carrying HLA-A2.1. *J. Immunol.*, 1995;154:2733-2742.
15. KITA, H, MORIJAMA, T, KANEKO, T, ET AL. HLA B44-restricted cytotoxic T lymphocytes recognizing an epitope on Hepatitis C virus nucleocapsid protein. *Hepatology*, 1993;18: 1039-1043.
16. HE, XS, REHERMANN, B, LOPEZ-LABRADOR, FX ET AL. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, 1999;96: 5692-5697
17. KOZIEL, MJ, DUDLEY, D, WONG, J, ET AL. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol.*, 1992;149: 3339-3344.
18. KOZIEL, MJ, DUDLEY, D, AFDHAL, N, ET AL. HLA class I restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus: identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokines release. *J. Clin Invest.*, 1995;96:2311-2315
19. WONG, DKH, DUDLEY, DD, AFDHAL, NH, ET AL. Liver derived CTL in Hepatitis C virus infection: breadth and specificity of responses in a cohort of persons with chronic infection. *J Immunol.*, 1998;160:1479-1488.
20. NELSON, DR, MAROUSIS, CG, DAVIS, GL, ET AL.. The role of hepatitis C virus specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J. Immunol.*, 1997; 158: 1473-1481.
21. NELSON, DR, MAROUSIS, CG, OHNO, T, ET AL. Intrahepatic Hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity and response to interferon alfa therapy in chronic Hepatitis C. *Hepatology*, 1998; 28:225-230.
22. MINUTELLO, MA, PILERI, P, UNUTMAZ, D ET AL. Compartmentalization of T-lymphocytes to the site of the disease: intrahepatic CD4+ T-cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med*, 1993;178: 17-26.
23. SCHIRREN, C.A., JUNG, M.-C., GERLACH, J.T., ET AL. Liver-derived hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ T cells recognize multiple HCV epitopes and produce interferon gamma. *Hepatology* 2000;32:597-603.
24. NUTI, S, ROSA, D., VALIANTE, NM, ET AL. Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for Va24+ T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *Eur.J.Immunol.*, 1998;28:3448-3455.
25. VALIANTE, NM, D' ANDREA, A, CROTTA, S ET AL. Life, activation and death of intrahepatic lymphocytes in chronic hepatitis C. *Immunol. Rev.*, 2000;174.
26. FARCI, P., SHIMODA, A., COIANA, A., ET AL. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000;288:339-344.

27. THURSZ, M, YALLOP, R, GOLDIN, R ET AL. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. *Lancet*, 1999;354: 2119-2124
28. BERTOLETTI, A, COSTANZO, A, CHISARI, FV ET AL. Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope. *J Exp Med*, 1994;180: 933-943.
29. BERTOLETTI, A, SETTE, A, CHISARI, FV, ET AL. Natural variants of cytotoxic epitopes are T cell receptor antagonists for anti-viral cytotoxic T cells. *Nature*, 1994;369: 407-410.
30. MEIER, UC, KLENERMAN, P, GRIFFIN, P, ET AL. Cytotoxic T lymphocytes lysis inhibited by viable HIV mutants. *Science*, 1995; 270: 1360-1362.
31. WEINER, A, ERICKSON, AL, KANSOPON, J, ET AL. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1995;92:2755-2759.
32. TSAI, SL, CHEN, YM, CHEN, MH ET AL. Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology*, 1998; 115: 954-966.
33. TAYLOR, DR, SHI, ST, ROMANO, PR ET AL. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*, 1999;285: 107-110
34. CHEN, CM, YOU, LR, HWANG, LH ET AL. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-b receptor modulates the signal pathway of lymphotoxin-b receptor. *J.Virol.*, 1997;9417-9426
35. ZHU, N, KHOSHANAN, A, SCHNEIDER, R ET AL. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J.Virol.*, 1998;3691-3697.
36. RAY, RB, MEYER, K, STEELE, R ET AL. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1998,273: 2256-2259.
37. YOU, L.R., CHEN, C.M., LEE, Y.H.W. Hepatitis C virus core protein enhances NF-kB signal pathway triggering by lymphotoxin-b receptor ligand and tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 1999,73: 1672-1681.
38. PILERI, P, UEMATSU, Y., CAMPAGNOLI, S ET AL. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998;282:938-941.
39. BRADBURY, LE, KANSAS, GS, LEVY, S, ET AL. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J. Immunol*, 1992 Nov 1;149(9):2841-50
40. FEARON, DT, CARTER, RH. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol*, 1995; 13: 127-149.
41. COOPER, NR, MOORE, MD, NEMEROW, GR. Immunobiology of CR2, the B lymphocyte receptor for Epstein-Barr virus and the C3d complement fragment. *Annu.Rev.Immunol.*, 1988;6:85-113.

## MECCANISMI MOLECOLARI E PATOGENESI DELL'EPATOCARCINOMA

Massimo Levrero (a,b)

(a)*Dipartimento di Medicina Interna, Università di Cagliari*

(b)*Fondazione Andrea Cesalpino, Università di Roma "La Sapienza, Roma.*

Il cancro del fegato, di cui il carcinoma epatocellulare (CEP o HCC, acronimo dall'inglese Hepato-Cellular Carcinoma) rappresenta oltre il 90% dei casi, si colloca al quinto posto tra tutte le neoplasie maligne, con un numero stimato nel 1990 di 437.000 nuovi casi (1,2). La distribuzione geografica eterogenea della prevalenza dell'HCC riflette l'impatto epidemiologico dei principali fattori etiologici e di rischio ambientali conosciuti, quali i virus epatitici HBV ed HCV e la micotossina aflatossina B1 (1-3). Di fatto la maggior parte degli HCC insorge come complicanza a lungo termine di epatiti croniche e cirrosi correlate all'infezione cronica da virus B e C dell'epatite (3). La cirrosi epatica, per il coesistere di necrosi, infiammazione e rigenerazione, rappresenta un fattore di rischio indipendente per l'insorgenza del carcinoma epatocellulare e viene ritenuta un fattore importante per l'acquisizione delle alterazioni genetiche che precedono o accompagnano lo sviluppo della neoplasia. L'HCC si associa infatti ad un'ampia varietà di alterazioni cromosomiche, che vanno dai riarrangiamenti genomici legati all'integrazione dell'HBV-DNA, alla perdita di eterozigosi (perdita di un allele) in numerosi loci su un ampio numero di cromosomi, ad amplificazioni geniche (aumento del numero di alleli). Nonostante l'aumento delle nostre conoscenze non è ancora chiaro in quale modo agiscano i diversi fattori di rischio e quale sia il loro contributo relativo alla carcinogenesi epatica e, soprattutto, come cooperano l'uno con l'altro a livello molecolare. Un aspetto fondamentale per la comprensione della patogenesi dell'HCC resta ancora quello di definire se e come, oltre che attraverso l'induzione di un processo infiammatorio cronico e della cirrosi, i virus epatitici possano contribuire direttamente alla trasformazione neoplastica dell'epatocita.

### **Epidemiologia e storia naturale**

L'*incidenza dell'HCC* è in crescita in molte aree del mondo e tale aumento è stato messo in relazione alla diffusione dell'infezione HCV (4-6). Negli studi italiani l'infezione da HCV e da HBV sono entrambe fortemente associate all'insorgenza dell'HCC (7-10) e la frazione attribuibile all'HCV risulta essere del 44% con un rischio attribuibile all'HBV del 20% (9). L'associazione tra infezione HCV ed HCC è confermata, come per il virus HBV, da numerosi studi di coorte e da oltre 20 studi caso-controllo, con un rischio relativo

superiore a 10 (2, 3). Il rischio relativo è sempre più basso nei paesi, come la Cina, la Corea o in Africa, dove l'HBV è endemico e sale nelle aree con bassa o intermedia endemicità dell'infezione HBV come Giappone, Spagna e Italia. Le stime disponibili sul rischio di HCC associato all'infezione da HCV sono state ottenute in studi prospettici condotti o in pazienti con epatite post-trasfusionale, in cui l'inizio dell'infezione è certo, o in pazienti con epatite cronica o cirrosi compensata, in cui però l'epoca dell'infezione non può essere dedotta sempre con precisione. L'insorgenza dell'HCC nei primi 10-15 anni dopo l'infezione è comunque un evento estremamente raro e il rischio si concentra nei pazienti che hanno già sviluppato una cirrosi, anche se vi sono segnalazioni di HCC insorti in pazienti non cirrotici con infezione HCV (11, 12). Le stime circa il rischio di HCC nei pazienti con infezione cronica da HCV senza cirrosi non sono concordi. Una serie di studi condotti in Giappone su pazienti con epatite cronica HCV ha mostrato una incidenza di HCC variabile tra 1.2 e 1.7 casi per anno per 100 pazienti (13). I pazienti con cirrosi HCV compensata, che hanno, così come i cirrotici HBV, un decorso stabile per periodi anche lunghi, mostrano una incidenza relativamente bassa ma costante nel tempo di HCC, variabile nei diversi studi prospettici di coorte condotti nei paesi occidentali tra 2.5 e 3.7 casi per anno per 100 pazienti (13). I fattori dell'ospite e virali associati ad un maggior rischio di sviluppo di HCC sono l'età, la bilirubina e la presenza di segni all'esame obiettivo (spider nevi, eritema palmare, circoli collaterali, ascite...) o di varici esofagee, tutti parametri che indicano uno stadio avanzato della cirrosi ed una malattia di più lunga durata. In due studi, condotti su cirrosi post-trasfusionali e pazienti emofilici con infezione da HCV, l'incidenza di HCC è stata maggiore nei pazienti che avevano ricevuto la trasfusione dopo i 50 anni di età, a suggerire l'esistenza di una correlazione tra età di acquisizione dell'infezione e rischio di HCC (13). L'importanza del genotipo virale infettante nel determinare il rischio di HCC, suggerita da alcuni, è tuttavia ancora oggetto di controversia (13). L'assunzione di alcool e la presenza di una coinfezione HBV e HCV rappresentano co-fattori di rischio certi per lo sviluppo dell'HCC e una meta-analisi recente sugli effetti della coinfezione HBV-HCV sullo sviluppo di HCC dimostra l'esistenza di un effetto non semplicemente additivo con un "odd ratio" di 165 per la coinfezione, di 17.3 per l'infezione HCV e di 22,5 per l'infezione HBV (13, 14).

La *storia naturale dell'HCC* e la prognosi sono strettamente condizionate dalla dimensione iniziale del nodulo, dalla mono o plurifocalità delle lesioni al momento della diagnosi, dal tasso di crescita e, soprattutto, dallo stadio funzionale della cirrosi associata. La presenza di noduli multipli alla diagnosi varia dal 13 al 32% nei diversi studi (13). La presenza di noduli multipli può essere il risultato sia di una precoce diffusione intraepatica della neoplasia con la formazione di noduli satelliti che dello sviluppo di più tumori indipendenti. L'analisi del DNA genomico tumorale in casi di HCC multifocale ha permesso di dimostrare che in circa il 50% dei casi le lesioni originavano verosimilmente in modo autonomo da diversi cloni epatocitari (15). Il pattern multinodulare tende ad essere più frequente nei pazienti con fattori etiologici multipli rispetto ai pazienti con infezione HCV

(16). Nella maggior parte dei pazienti in Asia, in Italia, in Francia ed in Spagna con piccoli HCC correlati all'HCV il tumore presenta una crescita "espansiva", è pseudo-capsulato e ben differenziato mentre nei pazienti sudafricani con infezione HBV prevalgono i tumori a carattere infiltrativo con evoluzione più aggressiva e prognosi nettamente peggiore. Il tasso di crescita del piccolo epatocarcinoma non trattato è estremamente variabile con tempi di raddoppiamento del volume della lesione che vanno da 1 mese a 20 mesi, con una mediana che è intorno ai 6 mesi (13). Numerosi studi indicano che nel complesso gli HCC correlati all'infezione da HCV hanno un comportamento biologico meno aggressivo dei tumori HBV-correlati che presentano più spesso un carattere infiltrativo e multifocale, invadono più spesso la vena porta e ricorrono più spesso dopo resezione.

### **Meccanismi molecolari nella patogenesi dell'epatocarcinoma**

L'assenza di una predisposizione ereditaria evidente per lo sviluppo di epatocarcinoma, quale quella presente nei carcinomi del colon-retto, della mammella e dell'ovaio, ha reso difficoltosa l'identificazione di geni chiave per lo sviluppo dell'epatocarcinoma e ha impedito la definizione di una gerarchia degli eventi genetici e delle alterazioni epigenetiche coinvolte nei vari stadi della carcinogenesi epatica. L'ipotesi, comunemente accettata, che il processo di trasformazione neoplastica procede attraverso l'accumulo successivo di mutazioni a carico dei geni che governano o la proliferazione cellulare o la morte cellulare programmata, trova sostegno in numerose osservazioni quali l'evidente aumento di incidenza di neoplasie con l'età e, soprattutto, la possibilità di identificare, a livello istopatologico, una serie di condizioni che sembrano rappresentare tappe intermedie del processo di trasformazione, dalla normalità alle lesioni preneoplastiche fino alla neoplasia con caratteri invasivi. Nel caso dell'HCC è stata descritta con sufficiente chiarezza la transizione dai noduli iperplastici al carcinoma epatocellulare ma l'identificazione di vere lesioni "pre-neoplastiche" e la loro definizione morfologica rimane ancora aperta. Sulla base degli studi di genetica molecolare effettuati nelle neoplasie del colon è stato ipotizzato che almeno quattro diverse alterazioni genetiche si devono realizzare perché la cellula tumorale acquisisca un fenotipo pienamente trasformato (17). La trasformazione neoplastica sembra procedere attraverso un processo di selezione simile ai modelli darwiniani di evoluzione della specie in cui attraverso una successione di alterazioni genetiche la cellula acquisisce progressivamente un vantaggio di crescita, che si traduce fenotipicamente nella conversione della cellula normale in una cellula neoplastica. L'esistenza di istotipi tumorali così diversi e numerosi e la stessa eterogeneità di lesioni genetiche descritte nelle neoplasie umane ha reso difficile definire in termini accettabilmente semplici ed unitari l'essenza della cellula tumorale e la relazione esistente tra fenotipo e genotipo neoplastico. In una revisione recente (18) è stato proposto che le alterazioni della

fisiologia cellulare che portano alla trasformazione maligna possono essere ricapitolate in sei elementi o caratteristiche essenziali: la capacità di proliferare indipendentemente dalla presenza di fattori di crescita (attivazione di oncogeni); l'insensibilità ai segnali antiproliferativi (inattivazione di anti-oncogeni o "tumor suppressor genes"); la capacità di sfuggire ai segnali apoptotici; la capacità di divisioni cellulari illimitate e, infine, l'acquisizione di capacità angiogeniche e metastatiche. L'acquisizione di queste caratteristiche, ciascuna capace di conferire alla cellula una "capacità" selettiva di crescita, può procedere sia attraverso vie meccanicisticamente diverse (lo stesso tratto fenotipico come risultato di varie alterazioni genetiche e funzionali) che secondo sequenze cronologiche alternative, e ciò non solo nei diversi tipi di neoplasie ma anche all'interno dello stesso tipo tumorale. Il processo di acquisizione delle diverse alterazioni genetiche mediante mutazioni a carico di determinati geni è comunque un processo inefficiente, in quanto contrastato costantemente dai numerosi meccanismi che tendono a garantire il mantenimento dell'integrità del genoma, sia per quanto riguarda la correttezza della duplicazione dell'informazione contenuta nel DNA (riconoscimento del "danno del DNA" ed enzimi di riparazione) che per quanto riguarda il monitoraggio della distribuzione del contenuto cromosomico durante la mitosi. Molecole chiave agiscono come "guardiani" in momenti specifici durante il ciclo cellulare, definiti "check-points", e attraverso la "certificazione" della qualità dei diversi processi determinano la progressione o meno della replicazione e della divisione cellulare. La perdita della funzione di uno di questi sistemi di controllo (prototipo dei sistemi di controllo dell'integrità genomica è rappresentato dall'oncosoppressore p53) provoca quella "instabilità" genomica che rappresenta la condizione permissiva fondamentale per la trasformazione neoplastica in quanto favorisce l'acquisizione progressiva da parte delle cellule preneoplastiche di mutazioni che conferiranno alla cellula le diverse "capacità" che caratterizzano la cellula maligna. L'analisi globale delle alterazioni genetiche presenti negli HCC dimostra che almeno quattro "pathway" diverse coinvolte nella regolazione della crescita e della morte cellulare (p53 e arresto di crescita/apoptosi in risposta al danno del DNA; pRb e controllo del ciclo cellulare; Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e inibizione della crescita/apoptosi cellulare;  $\beta$ -catenina e controllo della crescita e delle interazioni cellula-cellula) sono alterate preferenzialmente in queste neoplasie (19-21). Ciascuna di queste "vie" regolatorie è coinvolta però solo in una percentuale relativamente limitata di tumori epatici, a dimostrazione della sostanziale eterogeneità genetica degli HCC legata, verosimilmente, alla eterogeneità di fattori etiologici implicati. Gli effetti di tutte queste alterazioni genetiche si intersecano, nel determinare gli eventi che portano alla trasformazione neoplastica degli epatociti, con gli effetti di almeno due oncoproteine virali putative codificate una dai virus epatitici HBV (la proteina HBx) e l'altra dall'HCV (la proteina core) (21, 22).

## HCV e trasformazione epatocitaria

Come già ricordato, nella stragrande maggioranza dei casi l'HCC insorge anni dopo lo sviluppo di una cirrosi, sia essa correlata all'HBV o all'HCV. Nel caso dell'HCV è stato a lungo sostenuto che il suo potenziale oncogenico fosse essenzialmente relegato ad un ruolo di promozione dell'infiammazione epatica con i suoi cicli di necrosi e proliferazione/rigenerazione e quindi allo sviluppo della cirrosi (22, 23). Dal momento che l'HCV è un virus che non integra il proprio genoma in quello della cellula ospite non è presumibile un suo ruolo come "iniziatore" del processo di trasformazione cellulare. D'altro canto l'HCC associato ad infezione HCV sembra insorgere in pazienti più anziani e con malattia più severa rispetto a quanto avviene nei portatori di HBV. Anche se il microambiente infiammatorio proprio dell'epatopatia cronica ed ancor più la cirrosi sono determinanti importanti per l'epatocarcinogenesi, il riscontro di HCC in soggetti con infezione cronica HCV non cirrotici e la dimostrazione del potenziale oncogenico e di modulazione di funzioni regolatorie essenziali dell'epatocita di alcune proteine dell'HCV, tendono a dimostrare un ruolo diretto del virus nel processo di trasformazione epatocitaria. Alcuni studi, prevalentemente condotti in Giappone, volti a valutare l'incidenza di HCC in pazienti con cirrosi da HBV o HCV sembrano indicare che l'infezione HCV possa essere persino più "carcinogenica" dell'infezione HBV, ma tale osservazione non sembra avere un riscontro negli studi condotti nel mondo occidentale ed in Italia (23).

Scartata la possibilità di un meccanismo di *mutagenesi inserzionale* l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sulla caratterizzazione degli effetti di diverse proteine virali di modulare le funzioni cellulari legate alla proliferazione ed all'apoptosi. I prodotti virali di cui sono state descritte attività regolatorie biologiche potenzialmente rilevanti per il processo di trasformazione epatocitaria sono la proteina NS3; la proteina NS5A e la proteina core. L'espressione della parte N-terminale di NS3 è capace di trasformare fibroblasti murini immortalizzati NIH-3T3 e di indurre lo sviluppo di tumori in topi nudi (24). La proteina NS5A dell'HCV di genotipo 1 lega ed inibisce l'attività della PKR, una proteina chinasi indotta dall'interferone, impedendone la dimerizzazione (25, 26). La PKR, attivata dalla presenza di RNA a doppia catena, ha una serie di effetti pleiotropici che vanno dalla fosforilazione di una subunità di un fattore di iniziazione della traduzione a livello ribosomale con conseguente blocco della sintesi proteica, all'attivazione di NF $\kappa$ B, all'induzione di apoptosi, alla proliferazione cellulare (27). Il legame di NS5A e, come dimostrato recentemente, della proteina E2 alla PKR (28), permette ai virus C di genotipo 1 di sfuggire agli effetti antivirali dell'IFN- $\alpha$  e spiega almeno in parte la riconosciuta resistenza del genotipo 1 alla terapia con interferone. D'altro canto, cellule in cui l'attività della PKR è inibita sono resistenti all'apoptosi indotta da dsRNA esogeno (29). NS5a è anche in grado di modulare la trascrizione (30, 31), la trasduzione di segnali mitogenici (32), il ciclo cellulare (33) e la risposta apoptotica al TNF- $\alpha$  (34).

La proteina virale che è stata più studiata per le sue attività di modulazione di funzioni cellulari è comunque la proteina “core” la quale è in grado di interferire con il metabolismo lipidico (35, 36) e di modulare la trascrizione (37-42), la proliferazione cellulare (43-46) ed infine la morte cellulare programmata (47-50). Va sottolineato che i numerosi studi pubblicati contengono risultati spesso contraddittori e contrastanti. Per quanto riguarda la modulazione della trascrizione sia la proteina core selvaggia che forme di core troncate a localizzazione nucleare attivano NFκB con meccanismi ancora poco chiari (50-51). Core inoltre lega in vitro la p53 di cui, in studi di tipo funzionale, sarebbe in grado sia di inibire che attivare le funzioni (52-54). Dal punto di vista della modulazione della proliferazione l'espressione di core è in grado di immortalizzare epatociti primari in coltura (46) e di trasformare, in cooperazione con Ha-Ras, fibroblasti di ratto (43, 44). Secondo alcuni studi core blocca l'apoptosi indotta da TNF-α (interagendo con la porzione intracitoplasmatica del recettore ed impedendo il reclutamento del trasduttore denominato TRADD) (55, 56), dall'ingaggio del recettore Fas (attraverso l'induzione di NFκB) (50), dal farmaco chemioterapico cisplatino e dalla sovraespressione di c-myc (47). La proteina core attiva anche la via di segnalazione delle chinasi MAP (MAPKs o mitogen activated proteins kinases) (57) provocando un'attivazione prolungata nel tempo, dopo stimolazione con fattori di crescita, delle chinasi Erk1 ed Erk2, la cui funzione è soprattutto pro-proliferativa (58). Mentre nel caso dell'attivazione di NFκB il meccanismo di azione della proteina core non è chiaro, nel caso dell'attivazione delle MAPK è stato proposto che core agisca attraverso il legame con le proteine 14-3-3 e potenziando l'attività della chinasi Raf-1 (59). Nonostante vi siano aspetti poco chiari e risultati anche contraddittori, un ruolo diretto della proteina core nella trasformazione epatocitaria è suggerito sia dal riscontro di forme troncate della proteina C22 negli epatocarcinomi e, ancor più, dai risultati ottenuti nei topi transgenici core che sviluppano prima una steatosi epatica (60) e poi epatocarcinoma (61).

Numerosi studi epidemiologici e di storia naturale della cirrosi indicano che la presenza di una doppia infezione HBV (positività dell'HBsAg) e HCV (positività dell'anti-HCV) sembra avere un effetto sinergistico nel favorire l'insorgenza di epatocarcinoma (13, 23, . In effetti, le proteine regolatorie di HBV (HBx e preS/Str) e le proteine regolatorie di HCV (in particolare il core) condividono numerosi bersagli molecolari potenzialmente importanti nel favorire l'epatocarcinogenesi (22, 23). Vale la pena ricordare ancora come recentemente sia stata descritta la presenza di sequenze genomiche del virus HBV sia nel sangue che nel fegato di pazienti con infezione HCV in assenza dei marcatori sierologici di infezione HBV (62-65). Questa osservazione, unitamente al riscontro di sequenze HBV integrate e dell'mRNA virale della proteina trasformante HBx nel tessuto tumorale di pazienti con HCC senza marcatori sierologici HBV e HCV (22) ed agli studi funzionali, che hanno dimostrato la capacità di proteine HBV anche modificate prodotte a partire da sequenze virali integrate (proteine HBx troncate e proteine preS/S troncate) di produrre effetti profondi sulla regolazione della crescita cellulare (21, 22), fanno nel loro complesso

ritenere che il potenziale trasformante dell'HBV possa essere operante anche in molti casi fino ad oggi attribuiti ad altre etiologie, virali e non.

In conclusione, come succede per molti virus, alcune proteine codificate dal genoma dell'HCV interferiscono con i sistemi omeostatici cellulari e, potenzialmente, con la capacità del sistema immune dell'ospite, ad eliminare le cellule infettate, rendendo quindi le cellule epatiche suscettibili all'accumulo di nuove mutazioni che contribuiranno all'acquisizione di un fenotipo trasformato. Gli effetti diretti ed indiretti, attraverso l'induzione dell'infiammazione cronica, della necrosi e della rigenerazione, che i virus epatitici (HBV e HCV) esercitano nel fegato cooperano nell'attivazione e/o repressione dell'espressione di geni cruciali per la regolazione della crescita e della sopravvivenza cellulare. D'altra parte l'insorgenza dell'epatocarcinoma è sicuramente un processo lento in cui numerosi eventi oncogenici si accumulano nel tempo e sono verosimilmente tutti necessari per completare il processo multifattoriale che causa la trasformazione epatocitaria in vivo. Le proteine virali sembrano contribuire a tutti i momenti considerati importanti nella patogenesi molecolare dell'epatocarcinoma quali l'instabilità del genoma, la modulazione delle vie apoptotiche e l'induzione di proliferazione. Dal momento in cui la cellula subisce un danno, qualunque ne sia la causa può, da una parte, difendersi avviandosi a morte o a morte cellulare programmata (apoptosi), oppure, perduti i normali meccanismi di omeostasi, soccombere ad eventi mutazionali successivi che stabilizzano progressivamente l'acquisizione di un fenotipo tumorale.

### Bibliografia

1. BOSCH, X., RIBES, J., BORRAS, J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin. Liver Dis* 1999,19: 271-275.
2. International Agency for Research on Cancer. Hepatitis Viruses. IARC, *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Humans* 1994,p. 59, Lyon.
3. STUVER, S.O. Towards global control of liver cancer? *Sem Cancer Biol* 1998,8: 299-306.
4. OKUDA, K., FUJIMOTO, I., HANAI, A., URANO, Y. Changing incidence of hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer Res* 1987,47: 4967-4872.
5. LANDIS, S.H., MURRAY, T., BOLDEN, S., WINGO, P.A. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 1998,48:6-29.
6. EL-SERAG, H.B., MASON, A.C. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999,340: 745-750.
7. AIFS, Epidemiologia delle epatopatie acute e croniche in Italia. 1997.
8. SIMONETTI, R.F., CAMMA, C., FIORELLO, F. Hepatitis C virus as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. A case control study. *Ann Intern Med* 1992,116: 97-102.
9. STROFFOLINI, T., CHIARAMONTE, C., TIRIBELLI, C. Hepatitis C virus infection, HBsAg carrier state and hepatocellular carcinoma: relative risk and population attributable risk from a case control study. *J. Hepatol.* 1992, 16, 360-363.

10. CHIARAMONTE, M., STROFFOLINI, T., VIAN, A., STAZI, M.A., FLOREANI, A., LORENZONI, U., LOBBELLO, S., FARINATI, F., NACCARATO, R. Rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with compensated viral cirrhosis. *Cancer* 1999,85: 2132-2137.
11. BRALET, M.P., REGIMBEAU, J.M., PINEAU, P., DUBOIS, S., LOAS, G., DEGOS, F., VALLA, D., BELGHITI, J., DEGOTT, C., TERRIS, B. Hepatocellular carcinoma occurring in nonfibrotic liver: epidemiologic and histopathologic analysis of 80 French cases. *Hepatology* 2000,32: 200-4.
12. DE MITRI, M.S., POUSSIN, K., BACCARINI, P., PONTISSO, P., D'ERRICO, A., SIMON, N., GRIGIONI, W., ALERI, A., BEAUGRAND, M., PISI, E., BRECHOT, C., PATERLINI, P. HCV-associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet* 1995,345: 413-415.
13. COLOMBO, M. Natural history and pathogenesis of hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000,31S: 25-30.
14. DONATO, F., BOFFETTA, P., PUOTI, M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1998,75: 347-54.
15. SHEU, J.C., HUANG, G.T., CHOU, H.C. Multiple hepatocellular carcinomas at early stages have different clonality. *Gastroenterology* 1993,105: 1471-1476.
16. BENVIGNÙ, L., ALBERT, A. Different patterns of hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with HBV and HCV related cirrhosis: a long term prospective study. *Antiviral Therapy* 2000,5 S1: 75.
17. FEARON, E.R., VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
18. HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000,100: 57-70.
19. OZTURK, M. Genetic aspects of hepatocellular carcinoma. *Seminars in Liver Diseases* 1999,19: 235-242.
20. BUENDIA, M.A. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Seminars in Cancer Biology* 2000,10: 185-200.
21. LEVRERO, M., CHIRILLO, P., BALSANO, C., NATOLI, G. MOLECULAR BASIS. IN: LIVRAGHI T, MAKUUCHI M, BUSCARINI L. (Eds.) Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Greenwich Medical Media 1997, pp 27-34.
22. BRECHOT, C. Molecular mechanisms of hepatitis B and C viruses related liver carcinogenesis. In: Rizzetto M et al. (Eds). *Viral Hepatitis and Liver Disease* Torino, 1997.
23. OKUDA, K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000,32: 225-37.
24. SAKAMURO, D., FURUKAWA, T., TAKEGAMI, T. Hepatitis C virus non-structural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995,69: 3893-3896.
25. GALE, M.J. JR., KORTH, M.J., TANG, N.M., TAN, S.L., HOPKINS, D.A., DEVER, T.E., POLYAK, S.J., GRETCH, D.R., KATZE, M.G. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997,230: 217-27.
26. GALE, M. JR, BLAKELY, C.M., KWIECISZEWSKI, B., TAN, S.L., DOSSETT, M., TANG, N.M., KORTH, M.J., POLYAK, S.J., GRETCH, D.R., KATZE, M.G. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 1998,18: 5208-18.
27. WILLIAMS, B.R. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 1999,18: 6112-20.
28. TAYLOR, D.R., SHI, S.T., ROMANO, P.R., BARBER, G.N., LAI, M.M. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999,285: 107-10.
29. GALE, M. JR, KWIECISZEWSKI, B., DOSSETT, M., NAKAO, H., KATZE, M.G. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol* 1999,73: 6506-16.

30. KATO, N., LAN, K.H., ONO-NITA, S.K., SHIRATORI, Y., OMATA, M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997,71: 8856-9.
31. GHOSH, A.K., MAJUMDER, M., STEELE, R., YACIUK, P., CHRIVIA, J., RAY, R., RAY, R.B. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000,275: 7184-8.
32. TAN, S.L., NAKAO, H., HE, Y., VIJAYSRI, S., NEDDERMANN, P., JACOBS, B.L., MAYER, B.J., KATZE, M.G. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999,96: 5533-8.
33. GHOSH, A.K., STEELE, R., MEYER, K., RAY, R., RAY, R.B. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999,80: 1179-83.
34. GHOSH, A.K., MAJUMDER, M., STEELE, R., MEYER, K., RAY, R., RAY, R.B. Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF-alpha mediated apoptotic cell death. *Virus Res* 2000,67: 173-8.
35. BARBA, G., HARPER, F., HARADA, T., KOHARA, M., GOULINET, S., MATSUURA, Y., EDER, G., SCHAFF, Z., CHAPMAN, M.J., MIYAMURA, T., BRECHOT, C. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997,94: 1200-5.
36. SABILE, A., PERLEMUTER, G., BONO, F., KOHARA, K., DEMAUGRE, F., KOHARA, M., MATSUURA, Y., MIYAMURA, T., BRECHOT, C., BARBA, G. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology* 1999,30: 1064-76.
37. SHIH, C.M., LO, S.J., MIYAMURA, T., CHEN, S.Y., LEE, Y.H. Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. *J Virol* 1993,67: 5823-32.
38. RAY, R.B., LAGGING, L.M., MEYER, K., STEELE, R., RAY, R. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 1995, 37, 209-20.
39. SRINIVAS, R.V., RAY, R.B., MEYER, K., RAY, R. Hepatitis C virus core protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication. *Virus Res* 1996,45: 87-92.
40. SHRIVASTAVA, A., MANNA, S.K., RAY, R., AGGARWAL, B.B. Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *J Virol* 1998,72: 9722-8.
41. YOU, L., CHEN, C., LEE, Y. Hepatitis C virus core protein enhances NF-kB signal pathway triggering by lymphotoxin-b receptor ligand and Tumor Necrosis Factor Alpha *J Virol* 1999,72: 1672-1681
42. RAY, R.B., GOSH, A.K., MEYER, K., RAY, R. Functional analysis of a transrepressor domain in the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 1999,59: 211-217.
43. RAY, R.B., LAGGING, L.M., MEYER, K., RAY, R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transform primary rat embryo fibroblast to tumorigenic phenotype *J Virol* 1996,70: 4438-4443.
44. CHANG, J., YANG, S.H., CHO, Y., HWANG, S.B., HAHN, Y.S., SUNG, Y.C. Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene *J Virol* 1998,72: 3060-3065.
45. JIN, D.Y., WANG, H.L., ZHOU, Y., CHUN, A.C., KIBLER, K.V., HOU, Y.D., KUNG, H., JEANG, K.T. Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation. *EMBO J* 2000,19: 729-40.
46. RAY, R.B., MEYER, K., RAY, R. Hepatitis C virus core protein promotes immortalization of primary human hepatocytes. *Virology* 2000,271: 197-204.
47. RAY, R.B., MEYER, K., RAY, R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1996,226: 176-82.

48. RUGGIERI, A., HARADA, T., MATSUURA, Y., MIYAMURA, T. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1997,229: 68-76.
49. RAY, R.B., MEYER, K., STEELE, R., SHRIVASTAVA, A., AGGARWAL, B.B., RAY, R. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1998,273: 2256-9.
50. MARUSAWA, H., HIJIKATA, M., CHIBA, T., SHIMOTOHNO, K. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas and Tumor Necrosis Alpha-mediated apoptosis via NFkB activation. *J Virol* 1999,73: 4713-4720.
51. TAI, D., TSAI, S., CHEN, Y., CHUANG, Y., PENG, C., SHEEN, I., YEN, C., CHANG, K., HUANG, S., LIAW, Y. Activation of Nuclear Factor kB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2000,31: 656-664.
52. RAY, R.B., STEELE, R., MEYER, K., RAY, R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997,272: 10983-6.
53. RAY, R.B., STEELE, R., MEYER, K., RAY, R. Hepatitis C virus core protein represses p21WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity. *Gene* 1998,208: 331-6.
54. LU, W., LO, S., CHEN, M., WU, K., FUNG, Y.K., OU, J. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein *Virology* 1999,264: 134-141.
55. CHEN, C.M., YOU, L.R., HWANG, L.H., LEE, Y.H. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997,71: 9417-26.
56. MATSUMOTO, M., HSIEH, T.Y., ZHU, N., VANARSDALE, T., HWANG, S.B., JENG, K.S., GORBALENYA, A.E., LO, S.Y., OU, J.H., WARE, C.F., LAI, M.M. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997,71: 1301-9.
57. TSUCHIHARA, K., HIJIKATA, M., FUKUDA, K., KUROKI, T., YAMAMOTO, N., SHIMOTOHNO, K. Hepatitis C virus core protein regulates cell growth and signal transduction pathway transmitting growth stimuli. *Virology* 1999,258: 100-7.
58. GIAMBARTOLOMEI, S., COVONE, F., CARIANI, E., ARTINI, M., VOSSIO, S., LEVRERO, M., BALSANO, C. Sustained activation of the mitogenic MAP kinases intracellular signaling pathway by HCV core protein. *Antiviral Therapy* 2000,5: S73-74.
59. AOKI, H., HAYASHI, J., MORIYAMA, M., ARAKAWA, Y., HINO, O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol* 2000,74: 1736-41.
60. MORIYA, K., YOTSUYANAGI, H., SHINTANI, Y., FUJIE, H., ISHIBASHI, K., MATSUURA, Y., MIYAMURA, T., KOIKE, K. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 1997,78: 1527-31.
61. MORIYA, K., FUJIE, H., SHINTANI, Y., YOTSUYANAGI, H., TSUTSUMI, T., ISHIBASHI, K., MATSUURA, Y., KIMURA, S., MIYAMURA, T., KOIKE, K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998,9: 1065-7.
62. URASHIMA, T., SAIGO, K., KOBAYASHI, S. Identification of hepatitis B virus integration in hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma tissue. *J Hepatol* 1997,26: 771-778.
63. TAMORI, A., NISHIGUCHI, S., KUBO, S., KOH, N., MORIYAMA, Y., FUJIMOTO, S., TAKEDA, T., SHIOMI, S., HIROHASHI, K., KINOSHITA, H., OTANI, S., KUROKI, T. Possible contribution to hepatocarcinogenesis of X transcript of hepatitis B virus in Japanese patients with hepatitis C virus. *Hepatology* 1999,29: 1429-34.
64. SHIBATA, Y., NAKATA, K., TSURUTA, S., HAMASAKI, K., HAYASHIDA, Y., KATO, Y., NAKAO, K., EGUCHI, K. Detection of hepatitis B virus X-protein DNA in liver tissue from patient with hepatitis C virus-associated cirrhosis who subsequently developed hepatocellular carcinoma *Int J Oncol* 1999,14: 1153-6.

65. CACCIOLA, I., POLLICINO, T., SQUADRITO, G., CERENZIA, G., ORLANDO, M.E., RAIMONDO, G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999,341: 22-6.

## IMPLICAZIONI BIOLOGICHE E CLINICHE DELLA QUASISPECIE VIRALE

Patrizia Farci

*Dipartimento di Scienze Mediche Internistiche, Università di Cagliari*

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) costituisce un problema di sanità pubblica di primaria importanza in quanto questo virus rappresenta in tutto il mondo una delle cause più frequenti di epatite cronica, cirrosi ed epatocarcinoma (1-3). L'HCV è un piccolo virus ad RNA, la cui caratteristica biologica più importante è quella di indurre un'infezione cronica in un'altissima percentuale di casi. L'epatite C cronicizza, infatti, in più dell'80% dei soggetti infettati, ed il 20-35% di questi soggetti sviluppa la cirrosi nel corso della malattia (2). Studi prospettici sull'epatite post-trasfusionale e sull'epatite sporadica C sono stati fondamentali sia per definire la storia naturale della malattia che per analizzare gli eventi molecolari associati all'infezione acuta e cronica (4-5). L'epatite cronica C è caratterizzata da una replicazione continua del virus, documentata in alcuni soggetti per più di 20 anni (6). Sebbene il decorso clinico sia di solito indolente e subclinico, la malattia può in alcuni casi essere così rapidamente evolutiva da portare a morte il paziente entro 5-10 anni dall'infezione acuta (5). Le cause di questo tipo di decorso accelerato sono allo stato attuale sconosciute; studi prospettici non hanno infatti identificato alcun fattore clinico, sierologico o virologico che possa predire il decorso della malattia. Sebbene l'infezione cronicizzi nella maggioranza dei soggetti, in almeno il 15% dei casi l'infezione primaria è seguita dall'eradicazione del virus e da una guarigione completa. I correlati immunologici della eradicazione dell'HCV sono ancora sconosciuti.

Studi clinici e sperimentali condotti sia prima che dopo la scoperta del virus C suggerivano che quest'infezione non induce nell'ospite un'immunità protettiva. La prima dimostrazione in tal senso è emersa dall'analisi retrospettiva di una serie di studi di reinfezione crociata condotti negli anni '80, che hanno documentato che scimpanzè convalescenti non sono protetti contro la reinfezione da ceppi di HCV sia omologhi che eterologhi (7-8). L'analisi delle sequenze nucleotidiche ha dimostrato che la ricomparsa della viremia dopo ogni reinoculo non era dovuta alla riattivazione dell'infezione primaria, bensì alla reinfezione con il nuovo ceppo virale (7). Il rischio di sviluppare un'infezione cronica in seguito a reinfezione era simile a quello osservato dopo l'infezione primaria. Un'evidenza simile è stata in seguito ottenuta anche in bambini talassemici politrasfusi, nei quali è stato dimostrato che il virus C può causare più di un episodio di epatite acuta nello stesso soggetto (9). Il secondo episodio di epatite acuta era clinicamente indistinguibile dal primo ed era seguito in tutti i casi, in analogia a quanto osservato nel modello animale, dalla persistenza della viremia in parallelo allo sviluppo di un'epatite cronica istologicamente documentabile. Un'ulteriore dimostrazione che ha suggerito la mancanza di una immunità protettiva contro il virus C e' stata l'osservazione di una sovrainfezione con ceppi virali eterologhi, sia nello scimpanzè (10) che nella

specie umana (11).

I meccanismi responsabili della mancanza di immunità protettiva indotta dall'infezione da virus C, sia naturale che sperimentale, sono allo stato attuale ancora sconosciuti. Lo studio dei fattori legati all'ospite, come l'incapacità di generare una risposta immunitaria cellulare o umorale efficace, e dei fattori virali, come l'abilità del virus di elaborare strategie per eludere la sorveglianza immunologica, ha costituito negli ultimi anni un'area di ricerca molto intensa. L'osservazione che l'infezione da HCV induce una vigorosa risposta immunitaria sia di tipo cellulare che umorale, suggerisce che i fattori legati al virus giochino un ruolo di primaria importanza nei meccanismi di cronicizzazione (12). Al pari di altri virus ad RNA, l'HCV è caratterizzato da un alto grado di variabilità genetica. Negli ultimi anni, una serie di osservazioni ha suggerito che l'alta variabilità antigenica del virus C possa essere implicata nei meccanismi di cronicizzazione. Questo saggio è incentrato sulle implicazioni biologiche della variabilità antigenica del virus dell'epatite C, con particolare enfasi sulla quasispecie. Infatti sta emergendo sempre più chiaramente che la quasispecie può avere implicazioni molto importanti nella patogenesi, terapia e prevenzione dell'infezione da virus C.

### **La quasispecie del virus dell'epatite C**

L'HCV è un piccolo virus ad RNA che dal punto di vista tassonomico è stato classificato nella famiglia delle *Flaviviridae*, insieme ai flavivirus ed ai pestivirus, dove occupa da solo un nuovo genus indipendente (13). Il genoma virale è costituito da una singola catena di RNA lineare, a polarità positiva, di circa 9600 nucleotidi, che contiene un singolo "open reading frame". All'estremità 5' del genoma virale si trova una regione non-codificante di 340 nucleotidi, quindi i geni che codificano le proteine strutturali del virus, il core, l'envelope 1 e 2, sei proteine non-strutturali (NS) denominate NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, ed infine all'estremità 3' un'altra regione non-codificante di circa 150 nucleotidi.

L'alto grado di variabilità genetica del virus C è dovuto al fatto che la replicazione dei virus ad RNA è un processo ad alta probabilità di errore, poichè l'RNA polimerasi virale manca dell'attività 3'-esonucleasica, che costituisce un importante meccanismo di controllo e riparazione degli errori nell'incorporazione nucleotidica da parte della RNA polimerasi (14). Ne consegue pertanto un tasso di errore di circa 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> sostituzioni nucleotidiche per sito per anno (15-16). Come conseguenza della bassa fedeltà del macchinario di replicazione virale, l'HCV non è mai presente *in vivo* come popolazione omogenea di genomi ad RNA fra loro identici. La variabilità genetica del virus C è stata classificata gerarchicamente in 4 livelli: genotipo, sottogenotipo, isolato, quasispecie. Ciascun livello comprende virus che non sono identici tra loro, ma possono variare sia tra diversi individui che nell'ambito dello stesso individuo. Sono stati riconosciuti 6 diversi genotipi ed almeno 70 sottogenotipi. Gli isolati sono invece i ceppi virali ottenuti da diversi pazienti, che possono appartenere anche allo stesso genotipo e sottogenotipo.

La quasispecie indica invece la variabilità presente all'interno di un singolo individuo. Grazie all'introduzione di sofisticate metodologie di biologia molecolare, è stato possibile dimostrare che il virus C non circola mai *in vivo* sotto forma di popolazione omogenea di genomi tra loro identici, ma come popolazione complessa di virus diversi, sebbene altamente correlati, comunemente definita come quasispecie (17). Quasispecie è un termine introdotto negli anni 70' da Manfred Eigen per descrivere la distribuzione delle microvarianti presenti in una popolazione molecolare complessa (18). La quasispecie è costituita da un genoma cosiddetto "master", quantitativamente predominante, e da un insieme di genomi minori che possono differire dal ceppo dominante anche solo per una singola base e rappresentano, in misura variabile, la rimanente popolazione virale (19). In ogni momento, la predominanza del genoma "master" è verosimilmente dovuta ad una sua maggiore capacità replicativa, a fronte della pressione immunitaria esercitata dall'ospite in quel particolare momento. Il bersaglio contro cui agisce il sistema immunitario è rappresentato dunque dall'insieme dei genomi che costituiscono la quasispecie e non da una singola variante virale.

La frequenza di mutazione delle sequenze nucleotidiche non è distribuita in modo omogeneo nel genoma virale, ma è nettamente superiore nelle regioni che codificano per le due proteine dell'involucro virale (E1, E2). In particolare, la zona con la più alta variabilità è stata localizzata all'estremità 5' del gene E2, in una regione costituita da circa 81 nucleotidi e definita regione ipervariabile 1 (HVR1) (20). Il fatto che esista una regione così variabile nell'ambito del genoma virale è di fondamentale importanza sia per differenziare i diversi ceppi virali che per studiare il grado di complessità della quasispecie. Inoltre negli ultimi anni è stato dimostrato che la regione HVR1 è implicata nella neutralizzazione del virus C (21) e pertanto varia sotto la spinta della pressione selettiva del sistema immunitario dell'ospite (22).

### **Implicazioni cliniche della quasispecie dell'HCV**

*Quasispecie del virus C ed elusione del controllo immunitario* - Come detto sopra, una serie di osservazioni, come la mancanza di protezione dalla reinfezione con ceppi virali sia omologhi che eterologhi in scimpanzè convalescenti, l'insorgenza di episodi multipli di epatite acuta C nello stesso soggetto, la sovrainfezione di portatori cronici di HCV sia nella specie umana che negli scimpanzè, suggerivano che il virus C è incapace di indurre un'immunità protettiva. Inoltre, è stato dimostrato che scimpanzè vaccinati con proteine ricombinanti dell'involucro virale (E1/E2) erano protetti contro l'infezione con 10 CID del virus omologo, ma non con 64 CID di un virus eterologo correlato ed appartenente allo stesso genotipo e sottogenotipo (23). Ma la prova più convincente dell'assenza di un'immunità protettiva è il fatto che l'HCV induce una infezione cronica in più dell'80% dei soggetti infettati, nonostante la forte risposta immunitaria di tipo sia umorale che cellulare (24-25). I virus che persistono nell'ospite devono adottare strategie di successo per sopravvivere evitando il riconoscimento da parte del sistema immunitario. La variabilità genetica costituisce un importante

meccanismo attraverso il quale il virus C può eludere specificatamente la risposta immunitaria sia umorale che cellulare.

Uno degli ostacoli maggiori allo studio dell'immunità protettiva contro l'HCV è stato la mancanza di sistemi efficienti di propagazione del virus in vitro, che permetterebbero lo studio degli anticorpi neutralizzanti. Sebbene una modesta replicazione sia stata evidenziata in diverse linee cellulari (26), tali sistemi non sono sufficientemente sensibili e riproducibili per lo studio degli anticorpi neutralizzanti. Lo scimpanzè rimane pertanto l'unico modello per lo studio della neutralizzazione dell'HCV, anche se esistono ovvie limitazioni per il suo impiego routinario soprattutto perchè si tratta di un animale appartenente ad una specie costosa e protetta. Dati ottenuti sia in vivo nello scimpanzè che in vitro hanno fornito la prova più convincente che l'infezione da HCV induce anticorpi neutralizzanti (21-27). Tuttavia questi anticorpi sono tipospecifici, inefficaci contro i nuovi ceppi virali che emergono continuamente in vivo e soprattutto incapaci di prevenire l'evoluzione verso l'infezione cronica. Recentemente sono stati anche allestiti nuovi saggi in vitro per misurare gli anticorpi neutralizzanti anti-HCV, in particolare gli anticorpi in grado di bloccare il legame fra il virus o le proteine del mantello virale e la cellula. Zibert e coll. hanno dimostrato che sieri umani ottenuti precocemente dopo l'infezione acuta contengono anticorpi specifici per l'HVR1, che sono in grado di prevenire il legame dell'HCV alle cellule (28). Un altro sistema in vitro, basato sulla capacità della glicoproteina E2 ricombinante di legarsi alla superficie di cellule linfoidi umane, ha recentemente permesso l'identificazione di un recettore specifico per la glicoproteina E2, la molecola CD81 (29). Utilizzando questo sistema sono stati rilevati anticorpi in grado di neutralizzare il legame E2/CD81 in pazienti infettati con diversi genotipi di HCV. Scimpanzè vaccinati con la proteina E1/E2 ricombinante dimostravano titoli elevati che correlavano con la protezione dall'infezione con 10 CID di HCV (30).

Recentemente, si è dimostrato che la regione HVR1 del gene E2 rappresenta un bersaglio importante per gli anticorpi neutralizzanti (21). Numerose osservazioni avevano già suggerito che questa regione potesse essere coinvolta nella neutralizzazione dell'HCV. Questa ipotesi si basava sull'osservazione che la regione HVR1 è la più variabile dell'intero genoma virale (20), contiene epitopi lineari che sono riconosciuti da anticorpi presenti nei pazienti (22) e muta rapidamente in vivo (15,16), il che suggerisce che tale regione è soggetta alla pressione selettiva del sistema immunitario dell'ospite. Gli studi che hanno dimostrato che la regione HVR1 è un bersaglio fondamentale per la neutralizzazione hanno anche fornito un modello per studiare come, dalla complessa quasispecie dell'HCV, possono emergere mutanti virali che eludono la sorveglianza immunologica e la neutralizzazione (21). Per dimostrare che l'HVR1 è un bersaglio per gli anticorpi neutralizzanti è stato generato un siero iperimmune di coniglio contro un peptide sintetico corrispondente alla regione HVR1 del ceppo predominante contenuto nell'inoculo H77. Il siero iperimmune è stato quindi utilizzato per neutralizzare il medesimo ceppo virale, H77, e l'infettività residua è stata testata mediante inoculazione endovenosa in due scimpanzè sieronegativi. Dei due animali, uno non ha sviluppato alcun segno di infezione da HCV, mentre il secondo ha sviluppato un'epatite acuta

classica che e' evoluta verso la cronicità. Per interpretare i risultati di questo studio, è stata condotta un'approfondita analisi di sequenza della regione HVR1, sia del virus usato per l'inoculo che del virus recuperato dallo scimpanzè una settimana dopo l'inoculo. L'analisi di 104 cloni molecolari del virus H77 usato come inoculo ha dimostrato la presenza contemporanea di almeno 19 ceppi virali diversi, di cui uno era predominante, in quanto rappresentava il 57% di tutti i cloni, mentre gli altri erano molto meno rappresentati; almeno 11 ceppi virali erano presenti con un singolo clone (1%). L'analisi della quasispecie virale ottenuta dallo scimpanzè infettato ha dimostrato che nessuno dei cloni molecolari era identico al clone predominante di H77 che era stato usato per produrre il siero iperimmune di coniglio anti-HVR1. Le sequenze invece erano identiche a due varianti minori presenti nella quasispecie dell'inoculo, una corrispondente alla seconda variante presente in H77 (6%) ed una alla variante rappresentata dal 2% dei ceppi totali. Questi dati suggerivano che il siero iperimmune contro l'HVR1 era stato capace di neutralizzare il clone predominante, ma era inefficace contro le varianti minori che sono effettivamente emerse in vivo, seppure in un solo animale. L'osservazione che il siero iperimmune di coniglio anti-HVR1 era stato in grado di proteggere gli scimpanzè dall'infezione omologa ha dimostrato che gli anticorpi anti-HVR1 possono prevenire l'infezione da HCV. Tuttavia, l'incapacità da parte del siero iperimmune anti-HVR1 di prevenire l'emergenza di varianti minori, che erano già presenti nella complessa quasispecie virale, suggerisce che la capacità neutralizzante è di tipo specifica e ristretta al solo ceppo virale usato per l'immunizzazione.

Grazie alla recente produzione di un clone molecolare infettivo del virus C a partire dal ben caratterizzato ceppo virale H77, si è ottenuto un modello di studio estremamente importante per studiare gli effetti del sistema immune dell'ospite sull'evoluzione virale ed i correlati della persistenza virale (31-32). Uno studio di inoculazione sperimentale intraepatica in due scimpanzè utilizzando il primo clone molecolare infettivo, derivato dal ceppo H77, ha dimostrato che l'infezione cronica può svilupparsi nonostante la mancanza di una quasispecie virale nell'inoculo e, in particolare, di mutazioni nell'HVR1 (33). In contrasto con numerose osservazioni ottenute nella specie umana, i risultati di questo studio suggeriscono che il meccanismo di evasione immunologica ("immune escape") attraverso variazioni nell'HVR1 non sembra essere responsabile della persistenza dell'HCV negli scimpanzè (33). Tuttavia, non può essere escluso il ruolo di mutazioni in altre regioni del genoma, dove numerose variazioni sono state individuate. Le ragioni di queste discrepanze fra le due specie non sono al momento conosciute; tuttavia e' importante sottolineare che il sistema immunitario dello scimpanzè differisce profondamente da quello umano ed il quadro sperimentale di infezione con un clone molecolare nel modello animale è differente dal quadro della infezione naturale nella specie umana. Inoltre, mentre il clone molecolare comprende una singola specie virale, l'inoculo nell'infezione naturale è usualmente rappresentato da una complessa quasispecie virale. Indipendentemente da queste differenze, tuttavia, i dati di recente ottenuti nel modello animale possono riflettere l'esistenza di meccanismi alternativi di persistenza virale.

Come documentato per gli anticorpi neutralizzanti, anche per l'immunità cellulo-

mediata è stato dimostrato che il virus è capace di attuare strategie di evasione, come mutazioni specifiche all'interno di epitopi immunodominanti, che determinano un mancato riconoscimento da parte dei linfociti T-citotossici (CTL) specifici (34). Queste osservazioni suggeriscono che la risposta CTL, analogamente agli anticorpi neutralizzanti, può avere uno spettro d'azione isolato-specifico e quindi risultare inefficace contro ceppi mutanti presenti nella quasispecie dell'HCV o emergenti in vivo nel corso dell'infezione.

*La quasispecie ed il decorso dell'epatite acuta.* - Nonostante la grande maggioranza dei soggetti infettati dal virus C sviluppi un'epatite cronica, esiste un gruppo di individui (circa il 15-20%) che sviluppano un'epatite acuta auto-limitante con guarigione ed eradicazione del virus. I correlati immunologici dell'eliminazione del virus non sono ancora conosciuti, anche se è concepibile che il decorso della malattia è il risultato di una complessa interazione tra il virus e l'ospite durante le fasi più iniziali dell'infezione. Numerose linee di evidenza suggeriscono che la variabilità antigenica del virus C, e specificamente la quasispecie dell'HCV, permette al virus di eludere la sorveglianza immunitaria e di indurre in tal modo un'infezione cronica. Tuttavia il numero degli studi che hanno indagato l'evoluzione della quasispecie virale durante la fase acuta dell'epatite C è molto limitato, soprattutto a causa delle difficoltà nel reclutamento di pazienti durante le primissime fasi dell'infezione primaria e la mancanza di un follow-up a lungo termine. Il ruolo della quasispecie virale nell'infezione acuta è stato solo di recente analizzato (35). In campioni di siero sequenziali derivati da pazienti con differente decorso clinico, sono stati analizzati il numero di ceppi virali, la diversità genetica e l'evoluzione della quasispecie in parallelo ai livelli di replicazione ed alla risposta immunitaria umorale. Tre pazienti avevano un'epatite fulminante, 3 un'epatite acuta auto-limitante e 6 un'epatite cronica che è evoluta verso la cronicità; di questi ultimi 6 pazienti, 3 avevano una malattia stabile da più di 20 anni mentre negli altri 3 la malattia era rapidamente progressiva e letale entro 5 anni dall'infezione primaria. I risultati di questo studio hanno dimostrato che la dinamica dell'evoluzione della quasispecie virale durante la fase acuta dell'epatite C è un fattore predittivo dell'evoluzione clinica verso la risoluzione o la cronicità; invece, l'analisi della quasispecie nel primo campione viremico, entro 2-3 settimane dall'infezione primaria, non era in grado di differenziare tra l'epatite acuta auto-limitante e quella che cronicizza. L'epatite acuta auto-limitante era associata con l'emergenza di una popolazione virale relativamente omogenea prima dell'eliminazione del virus, mentre l'epatite acuta che progredisce correlava con una rapida evoluzione genetica entro i primi 4 mesi dall'infezione. La presenza di una pressione selettiva da parte del sistema immunitario era suggerita dal fatto che le mutazioni nucleotidiche erano prevalentemente di tipo non-sinonimo, si verificavano quasi esclusivamente nella regione HVR1 del gene E2, e correlavano temporalmente con la sierconversione anticorpale. Il decorso della malattia era indipendente sia dai livelli di viremia che dal genotipo virale. Un quadro singolare è stato invece osservato nei pazienti con epatite fulminante che, nonostante gli alti livelli di

viremia presentavano il più basso grado di diversità genetica, con una popolazione virale altamente omogenea. Questi dati fanno ipotizzare l'esistenza di una pressione negativa che previene la comparsa di mutazioni amminoacidiche, presumibilmente finalizzata alla conservazione della peculiare "fitness" di un ceppo virale particolarmente virulento.

In conclusione, l'alto grado di variabilità genetica dell'HCV in vivo, che si manifesta con la presenza di una complessa quasispecie virale e con l'emergenza di virus che eludono la sorveglianza immunitaria, insieme con l'evidenza di una ristretta risposta immunitaria neutralizzante suggeriscono l'esistenza di un equilibrio in continuo mutamento tra il virus e l'ospite.

### **Bibliografia**

1. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel statement: management of hepatitis C. *Hepatology* 1997, 26:2S-10S.
2. SEEFF LB. Natural history of viral hepatitis, type C. *Semin Gastrointest Dis* 1995,6: 20-27.
3. DI BISCEGLIE AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1995, 15: 64-69.
4. ALTER MJ, MARGOLIS HS, KRAWCZYNSKI K, ET AL. The natural history of community acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992, 327:1899-1902.
5. ALTER, HJ. To C or not to C: These are the questions. *Blood* 1995, 85:1681-1695.
6. FARCI P, ALTER HJ, WONG D, ET AL. Long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1991,325:98-104.
7. FARCI P, ALTER HJ, GOVINDARAJAN S, ET AL. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992,258:135-140.
8. PRINCE AM, BROTMAN B, HUI MA T, ET AL. Immunity in hepatitis C infection. *J Infect Dis* 1992,165:438-443.
9. LAI ME, MAZZOLENI AP, ARGIOLOU F, ET AL. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassemic children. *Lancet* 1994,343:388-39
10. OKAMOTO H, MISHIRO S, TOKITA H, ET AL. Superinfection of chimpanzees carrying hepatitis C virus of genotype II/1b with that of genotype III/2a or I/1a. *Hepatology* 1994,20:1131-1136.
11. KAO JH, CHEN PJ, LAI MY, CHEN DS. Superinfection of heterologous hepatitis C virus in a patient with chronic type C hepatitis. *Gastroenterology* 1992,105: 583-587.
12. FARCI P, PURCELL RH. The clinical significance of genotypes and quasispecies. *Semin. Liver Dis.* 2000, 20: 103-26.

13. HOUGHTON M. Hepatitis C virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanok RH, eds. *Fields Virology*. Third Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p.1035-1058.
14. HOLLAND J, SPINDLER K, HORODYSKI F, ET AL. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 1982,215:1577-1585.
15. OGATA N, ALTER HJ, MILLER RH, PURCELL RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991,88:3392-3396.
16. OKAMOTO H, KOJIMA M, OKADA S-I, ET AL. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 1992,190: 894-899.
17. MARTELL M, ESTEBAN JL, QUER J, ET AL. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992,66:3225-3229.
18. EIGEN M. Self organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* 1972,58:465:
19. DOMINGO E, HOLLAND JJ. High error rates, population equilibrium and evolution of RNA replication systems. In: Domingo E, Holland JJ, Ahlquist P (Eds). *RNA Genetics*, vol 3. CRC, Boca Raton 1988. p.3-36
20. WEINER AJ, BRAUER MJ, ROSEMBLATT J, ET AL. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991,180:842-848.
21. FARCI P, SHIMODA A, WONG D, ET AL. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996,93:15394-15399.
22. WEINER AJ, GEYSEN HM, CHRISTOPHERSON C, ET AL. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992,89:3468-347
23. HOUGHTON M, CHOO Q-L, CHIEN D, ET AL. Development of an HCV vaccine. In Rizzetto M., Purcell R.H., Gerin J., Verme G. (Eds). *Viral hepatitis and Liver Diseases*. Edizione Minerva Medica Torino 1997. p.656-65
24. BOTARELLI P, BRUNETTO MR, MINUTELLO MA, ET AL. T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993,104:580-587.
25. MISSALE G, BERTONI R, LAMONACA V, ET AL. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996,98:706-714.
26. SHIMIZU YK, IWAMOTO A, HIJIKATA M, ET AL. Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992,89: 5477-5481.
27. SHIMIZU YK, IGARASHI H, KIYOHARA T, ET AL. A Hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* 1996,223:409-412.
28. ZIBERT A, SCHREIER E, ROGGENDORF M. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology* 1994,208:653-661.
29. PILERI P, UEMATSU Y, CAMPAGNOLI S, ET AL. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998,282:938-941.
30. ROSA D, CAMPAGNOLI S, MORETTO C, ET AL. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to hepatitis C virus: cytofluorometric assessment of envelope glycoprotein E2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996,93:1759-1763.
31. KOLYKHALOV AA, AGAPOV EV, BLIGHT K, ET AL. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997,277:570-574.
32. YANAGY M, PURCELL RH, EMERSON SU, BUKH J. Transcripts from a single full-length c DNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997,94:8738-874

33. MAJOR ME, MIHALIK K, FERNANDEZ J, ET AL. Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. *J Virol* 1999,73:3317-3325.
34. WEINER A, ERICKSON AL, KANSOPON J, ET AL. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995,92:2755-2759.
35. FARCI P, SHIMODA A, COIANA A, DIAZ G, PEDDIS G, MELPOLDER JC, STRAZZERA A, CHIEN DJ, MUNOZ SJ, BALESTRIERI A, PURCELL RH, ALTER HJ. The outcome of hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000,288: 339-44.

## **LE MANIFESTAZIONI EXTRAEPATICHE**

Francesco B. Bianchi, Antonina Smedile

## **LA CRIOGLOBULINEMIA MISTA: STORIA NATURALE ED APPROCCI TERAPEUTICI**

Cesare Mazzaro (a), Gabriele Pozzato (b)

(a) *Terza Unità Operativa di Medicina Interna, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli" Pordenone*

(b) *Dipartimento di Medicina & Neurologia, Unità Clinico-Operativa Medicina Clinica, Ospedale di Cattinara, Trieste;*

La crioglobulinemia mista (CM) è una malattia sistemica, ad andamento cronico, caratterizzata da lesioni vasculitiche a carico della cute e degli organi interni, secondarie alla deposizione degli immunocomplessi circolanti crioprecipitabili e complemento (Gorevic et al., 1980; Ferri et al., 1993; Abel, 1993). La CM viene classificata nell'ambito delle vasculiti sistemiche interessanti vasi di medio e piccolo calibro. I sintomi principali sono la porpora, astenia, artralgie e vi può essere interessamento di vari organi: fegato, rene, sistema nervoso periferico (Lo Spalluto et al., 1962). La presenza dell'espansione monoclonale dei B linfociti nel midollo osseo e nel sangue periferico, presente in tutte le forme di CM di tipo II, pone la CM fra le malattie linfoproliferative, ad andamento "benigno", con possibilità di evolvere in una piccola percentuale di casi verso un linfoma non Hodgkin (Monteverde et al., 1988; 1995; Ferri et al., 1994; Pozzato et al., 1994).

### **Classificazione delle crioglobuline (Brouet et al., 1974)**

Attualmente, sulla base delle caratteristiche molecolari ed immunochimiche (Brouet et al., 1974), le crioglobuline (vedi Tabella 1), sono state distinte in 3 tipi:

#### **Tipo I** (Crioglobulina singola monoclonale)

- Si tratta di immunoglobuline monoclonali tipicamente della classe IgM, mentre solo raramente appartengono alla classe delle IgG. Questo tipo di crioglobuline si riscontra nella Malattia di Waldenstrom, nel Mieloma, o più raramente in altre malattie linfoproliferative.

#### **Tipo II** (Crioglobulinemia mista con componente monoclonale)

- La crioglobulinemia mista viene definita di tipo II quando coesistono una componente monoclonale (di solito IgM, mentre raramente è IgG o IgA) con specificità anticorpale nei confronti delle IgG (attività fattore reumatoide) e una componente policlonale, di solito IgG. Questo tipo di crioglobulina è

abituale associata a malattie linfoproliferative, malattie autoimmuni e malattie infettive.

**Tipo III** (Crioglobulinemia mista con componenti esclusivamente policlonali)

- La crioglobulinemia mista di tipo III comprende immunoglobuline policlonali delle classi IgG e IgM, non dotate di attività fattore reumatoide. Questo tipo di crioglobulina è associata a malattie infettive e malattie autoimmuni.

È possibile suddividere la CM in tre stadi clinici, corrispondenti ad una malattia progressivamente più severa e ad una prognosi più infausta, ed in due varietà cliniche, A e B, a seconda che la funzionalità renale sia normale o alterata.

La stadiazione della CM risulta di fondamentale importanza sia per la valutazione della prognosi, che per l'approccio terapeutico.

**Stadio I:**

- Porpora a livello dei segmenti distali degli arti inferiori
- Astenia
- Artralgie
- Funzione epatica normale
- Bilirubinemia totale <2.0 mg/dL, Albuminemia >3.5 g/dL, INR <1.2
- Quadro istologico epatico di lesioni minime o epatite cronica persistente
- Infiltrati B linfocitari a livello midollare

**Stadio II:** come stadio I più:

- Porpora agli arti inferiori e al tronco (score 2)
- Neuropatia periferica, sensitivo-motoria, lieve o moderata
- Danno epatico moderato
- Bilirubinemia totale compresa tra 2.0 e 3.0 mg/dL, Albuminemia compresa tra 3.5 e 2.8 g/dL, INR >1.2
- Quadro istologico epatico di epatite cronica attiva

**Stadio III:** come stadio II più:

- Ulcere cutanee arti inferiori e/o al tronco
- Neuropatia periferica sensitivo-motoria grave
- Quadro istologico/biumorale di cirrosi epatica
- Segni di ipertensione portale e/o encefalopatia epatica
- Quadro istologico osteomidollare (o linfonodale) di LNH

**Varietà A**

Funzione renale normale definita come:  
Creatinina < 1,4 mg/dL,  
proteinuria < 0,14 g/24 ore

**Varietà B**

Funzione renale alterata definita come:  
Creatinina >1,4 mg/dL e/o  
Proteinuria > 0,14 g/24 ore

La presenza di disordini linfoproliferativi è costantemente associata alla crioglobulinemia di tipo I, mentre la crioglobulinemia di tipo II è considerata una malattia monoclonale a cellule B solo in una frazione di pazienti. Il tipo III è più problematico: quelle secondarie a infezione acuta o cronica si possono ritenere una risposta (più o meno transitoria) alla stimolazione antigenica, mentre le rimanenti come una possibile malattia linfoproliferativa.

**Crioglobulinemia mista e virus dell'epatite C**

Recentemente numerosi autori hanno riportato una stretta associazione tra l'infezione da virus C e la crioglobulinemia mista (Agnello et al., 1992). La presenza degli anticorpi Anti-HCV nei pazienti affetti da CM è stata riscontrata nel 60-75%, mentre la ricerca dell'RNA virale con la tecnica PCR rivela una positività superiore all'80%, anche in assenza di anticorpi anti-HCV. Inoltre recenti studi hanno dimostrato la presenza dell'RNA virale nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di soggetti affetti da CM senza livelli dosabili di anticorpi anti-HCV e senza HCV-RNA nel siero (Ferri et al., 1993). Sulla base di questi dati, l'HCV sembra essere associato alla CM nella quasi totalità dei casi, anche in assenza di malattia cronica di fegato e potrebbe essere il principale agente eziologico della CM.

La prevalenza del disordine linfoproliferativo nella CM, definita dalla presenza di una monoclonalità delle cellule B del midollo osseo, è presente in almeno la metà dei pazienti se tale monoclonalità viene ricercata con tecniche citofluorimetriche (Mazzaro et al., 1995), ma se tale componente B monoclonale viene ricercata mediante determinazione del riarrangiamento genico delle immunoglobuline con tecniche di amplificazione genica, tutti i pazienti affetti da CM di tipo II rivelano tale espansione monoclonale non solo nel midollo, ma anche nelle cellule mononucleate del sangue periferico (Franzin et al., 1995).

Sulla base di tali osservazioni, la CM di tipo II può essere considerata un disordine linfoproliferativo monoclonale sin dall'esordio.

Recenti studi (Pozzato et al., 1994; Monteverde et al., 1995) hanno dimostrato lo sviluppo di LNH a cellule B in una piccola percentuale di pazienti affetti da CM associata ad infezione da HCV.

Per meglio definire il ruolo della infezione da HCV nella patogenesi della CM e dei disordini linfoproliferativi correlati abbiamo studiato i principali aspetti clinici, istologici e virologici di un gruppo di 155 pazienti affetti da CM, seguiti per un periodo di 8 anni.

Le principali caratteristiche cliniche e sierologiche di 155 pazienti sono sintetizzati nelle Tabelle 1 e 2.

**Tabella 1 -** *Caratteristiche cliniche e istologiche alla presentazione in 155 casi di CM*

<b>N° soggetti</b>	<b>155</b>
Età media (anni)	62.4 (28-78)
Rapporto M/F	52/103
Trasfusioni	33 (21%)
Durata media infezione HCV (mesi)	74±48
Follow-up medio (mesi)	67 (6-98)
Astenia	79%
Porpora	90%
Ulcere arti inferiori	8%
Fenomeno di Raynaud	30%
Artralgie	74%
Neuropatia periferica	17%
Nefropatia	10%
Malattia Cronica di Fegato	57%
Splenomegalia	58%
Adenopatie periferiche	2,5%
Linfoma non Hodkin (cellule B)	18%

**Tabella 2 -** *Caratteristiche sierologiche e virologiche alla presentazione in 155 casi di CM*

Tipo di CM	I / II /III	0.6%/7 2% / 27 %
Criocrito medio (%)		4.9 ± 4.4
RF, media ± DS(VN < 25)		70%, v.m. 311±322
C4 media ± DS (VN > 15)		84%, v.m. 10.9±5.1
AST (U/L)		65.9±37.0
ALT(U/L)		80.1±44.2
Creatinina (VN < 1.4)		10%, v.m. 1.1 ± 0.4
Proteinuria (VN < 0.8g/24h)		10%, v.m. 0.7 ± 4.8
ANA (> 1:40)		5%
AMA (> 1:20)		2%
ASMA (> 1:40)		21%
Anti HCV		95%
HCV-RNA		95%
HBsAg+		4%
Anti-HBs		22%
Anti-HBc		18%
HBsAg+ /Anti-HCV+		3.2%

In 16 casi che presentavano una proteinuria totale delle 24 ore è stata eseguita la biopsia renale e all'esame istologico è stata osservata la presenza di una glomerulonefrite membrano-proliferativa tipo I in 18 casi (94.4%) e glomerulonefrite membranosa in 1 caso (5.6%).

La biopsia epatica è stata eseguita in 93 casi (60.0%) che presentavano segni clinici e/o biomorali di malattia cronica di fegato. La diagnosi istologica ha evidenziato la presenza di epatite cronica minimale in 2 casi (2.1%), epatite cronica lieve in 9 casi (9.7%), epatite cronica moderata in 10 casi (10.7%), epatite cronica severa in 27 casi (29.0%) e cirrosi epatica in 43 casi (46.2%).

La biopsia osteo-midollare eseguita in 88 casi (56.7%), è risultata normale in 35 casi (37%). In 20 casi (17%) la biopsia osteomidollare ha presentato un'infiltrato linfoide reattivo. Nei rimanenti casi erano presenti infiltrati linfoidi paratrabecolari di piccoli linfociti ed elementi linfoplasmocitoidi suggestivi in 27 casi (25%) per Linfoma non-Hodgkin a basso grado di malignità gruppo (A) secondo la W.F. e Linfoma a piccoli linfociti/linfoplasmocitoide secondo la classificazione REAL. La diagnosi è stata supportata da una infiltrazione osteo-midollare superiore al 50% con la presenza di linfociti linfoplasmocitoidi (CD19+ e CD20+); la presenza di leucemia linfatica cronica era esclusa dal basso numero di cellule CD5+ (inferiori a 15%) e da alte concentrazioni di catene leggere sulla superficie cellulare. Inoltre l'istologia osteomidollare in 2 casi (1.4%) presentava un linfoma centrofollicolare, in 2 casi (1.4%) linfoma diffuso a cellule miste, in 1 caso (0.7%) linfoma diffuso a cellule larghe e in 1 caso (0.7%) linfoma tipo MALT.

Il follow-up a lungo termine di questi pazienti ha mostrato una progressione della malattia linfoproliferativa in 7 casi (4.5%) con la comparsa di splenomegalia e linfadenomegalia, e l'esame istologico osteomidollare ha mostrato la presenza di un linfoma a piccoli linfociti in 5 casi (3.2%), linfoma follicolare 1 caso (0.6%), linfoma diffuso a cellule larghe 1 caso e linfoma tipo MALT 1 caso. Il numero complessivo dei LNH alla fine del follow-up era di 40 casi (26%) .

I principali dati virologici sono riportati in Tabella 2. La quasi totalità dei pazienti (95%) era positiva per la presenza degli anticorpi anti-HCV. Solo 6 pazienti (4%) erano positivi per HBsAg, mentre anti-HBsAg era positivo nel 22% dei casi e anti-HBc nel 18% dei casi. Nessuno di questi pazienti era in fase di replicazione virale, poichè il HBV-DNA era assente. In 5 casi (3.2%) è stata riscontrata l'associazione HBsAg e Anti-HCV.

La determinazione dell'HCV-RNA effettuata mediante PCR è risultato positivo in 88 casi (95%). La determinazione del genotipo dell'HCV eseguito in 117 casi (75.4%), ha evidenziato la presenza di tutti i genotipi noti, con un'alta prevalenza del genotipo 1b (72 casi, 60.5%), mentre inferiore è risultata a prevalenza del genotipo 1a (2 casi, 1.7%), 2a (24 casi, 20.1%), 2c (4 casi, 3.4%), 3a (3 casi, 2.5%) e delle coinfezione (9 casi, 7.5%) .

Un gruppo di 142 casi (92%) sono stati valutati con un follow-up da 12 a 98 mesi.

E' stata osservata una progressione di malattia in 45 casi (32%) ed il decesso in 26 pazienti (18%). Le cause del decesso sono state insufficienza epatica in 15 casi (76%), complicanze cardiovascolari in 3 casi (1.5%), setticemia in 7 casi (26.9%), insufficienza renale 1 caso (3.8%), infarto intestinale in 1 caso e LNH in 1 caso.

Sette pazienti con CM trattati con Interferone alfa (3 MU sc X 3 volte alla settimana per 12 mesi) sono stati considerati "long term responder" in quanto hanno

eliminato l'HCV-RNA, normalizzato le transaminasi ed eliminate le crioglobuline dal circolo. In 4 di questi che presentavano infiltrato linfoide paratrabecolare nel midollo è stato osservato la regressione dell'infiltrato midollare e la scomparsa della monoclonalità nelle cellule mononucleate del sangue periferico.

I rimanenti 70 pazienti (49%) sono attualmente in trattamento con interferone alfa, prednisone, dieta ipoantigenica o cicli periodici di plasmateresi e ciclofosfamide.

Il presente studio conferma le precedenti osservazioni della associazione tra CM e infezione da HCV. Nei nostri 155 pazienti, la presenza degli anticorpi anti-HCV e di HCV-RNA era alta (95%). La presenza del virus era associata con segni clinici e biomorali di malattia cronica di fegato solo in 88 casi (57%).

Questi dati indicano che il virus C sembra giocare un ruolo importante nello sviluppo di alcune malattie ematologiche maligne. E' noto che l'HCV non è un retrovirus, non è dotato di trascrittasi inversa e di oncogeni propri, esso non può quindi essere considerato un tipico virus oncogenetico, e pertanto una trasformazione neoplastica diretta della cellula ospite appare del tutto inverosimile. Inoltre non sono mai stati trovati integrati nel DNA delle cellule ospiti sequenze del genoma dell'HCV.

Poichè l'oncogenesi del linfoma è generalmente considerata un processo multifattoriale, la persistenza dell'HCV nell'organismo, interferendo con le cellule del sistema immune, potrebbe causare l'espansione di cloni linfocitari secernenti crioglobuline, e attraverso un meccanismo diretto o indiretto determinare eventi mutazionali che potrebbero portare ad una neoplasia a cellule B. Per meglio comprendere come l'HCV determini il linfoma a cellule B abbiamo sequenziato i geni della regione variabile delle catene leggere e pesanti delle immunoglobuline in 10 pazienti affetti da immunocitoma HCV positivi. L'analisi delle sequenze mostrò in tutti i pazienti, che in queste regioni era presente un grande numero di mutazioni somatiche ciò significa che i linfomi HCV correlati potrebbero essere causati da stimolazione antigenica. Questi dati indicano che il linfoma è il risultato della stimolazione cronica del sistema immune da parte di antigeni virali o da immunocomplessi contenenti l'antigene stesso. Se in questo stadio della malattia la replicazione virale viene soppressa, la proliferazione delle cellule B può regredire. Infatti dal momento che numerosi lavori hanno segnalato una buona efficacia dell'IFN alfa nel trattamento della CM, abbiamo usato questo farmaco in diversi gruppi di pazienti affetti da questa malattia in diversi trials (Ferri et al., 1993; Mazzaro et al., 1994; Dammacco et al., 1994). Un'esame accurato dei parametri ematologici prima e dopo il trattamento ci ha permesso di osservare che in alcuni pazienti si è verificata una eradicazione del virus C e la regressione dell'infiltrato monoclonale nel midollo osseo e nel sangue periferico (Mazzaro et al., 1996). Per contro in numerosi casi non responder è stata notata la comparsa di un'infiltrato linfoide monoclonale B nel midollo osseo. Questo indica che la malattia monoclonale a cellule B è sostenuta dalla proliferazione virale e che l'eradicazione del virus può farla regredire (Mazzaro et al., 1996).

### **Interferone alfa nella crioglobulinemia mista**

Tradizionalmente la crioglobulinemia mista (CM) veniva trattata con farmaci immunosoppressori a dosaggi medio-bassi nell'ipotesi di una patogenesi autoimmune, in analogia a quanto si effettuava nelle altre malattie vasculitiche. La terapia steroidea ad alto dosaggio veniva riservata nelle fasi di grave compromissione renale della glomerulonefrite crioglobulinemica. Se la componente IgM era molto elevata, con rischio di sindrome da iperviscosità, veniva utilizzata la plasmaferesi in associazione con la ciclofosfamide. Tale farmaco sembrava essere la terapia di scelta anche nelle sindromi linfoproliferative associate alla CM. In seguito alla scoperta della stretta associazione tra CM e il virus dell'epatite C, attualmente si tende a utilizzare sempre di meno la terapia steroidea nel timore di favorire la replicazione virale. Oggi, innovative tecnologie hanno reso possibile l'introduzione in commercio di nuovi farmaci, in primo luogo dell'interferone, che ha rivoluzionato l'approccio terapeutico alla crioglobulinemia mista.

L'impiego dell'Interferone alfa (IFN) nella CM iniziò nell'ormai lontano 1987 (Bonomo et al., 1987) non appena questa classe di farmaci si rese disponibile. Non essendo ancora nota l'eziologia della malattia, l'IFN venne utilizzato per la sua azione antiproliferativa e immunomodulante. L'evidente, e quasi inaspettato, successo terapeutico venne allora attribuito alla capacità del farmaco di inibire selettivamente i cloni B linfocitari produttori delle crioglobuline. Dopo la scoperta del virus dell'epatite C, si riscontrò immediatamente la strettissima associazione tra HCV e crioglobulinemia, e non solo nei casi in cui la crioglobulinemia era associata a un'epatite cronica, ma anche in quelli in cui non era presente alcun interessamento epatico. Sulla base dei successi ottenuti con l'impiego dell'IFN nella terapia dell'epatite cronica HCV-positiva, è sembrato razionale utilizzare tale farmaco anche nella CM. L'IFN, infatti, sembra costituire la terapia di elezione della malattia in quanto è diretto contro l'agente eziologico della stessa. Il suo effetto benefico però non è da attribuire soltanto alla sua attività antivirale, ma probabilmente anche alla sue azioni antiproliferative, con inibizione dei linfociti B monoclonali che producono crioglobuline, e immunomodulanti, con ridotta sintesi di immunoglobuline. La valutazione della risposta nei soggetti crioglobulinemici trattati con IFN non è semplice come nei pazienti con epatite cronica da HCV in quanto mentre in questi ultimi gli unici parametri da valutare sono le transaminasi e l'HCV-RNA, nei primi sono da considerare una serie di elementi clinici e laboratoristici i quali possono presentare risposte non concordi, ad esempio la terapia può determinare una completa scomparsa della porpora o delle artralgie, mentre le transaminasi, invece di normalizzarsi, rimangono alterate. Perciò non sempre i risultati dei singoli lavori pubblicati sono paragonabili e il concetto stesso di "risposta" alla terapia può essere diverso da autore ad autore.

La dose di IFN utilizzata dalla maggior parte degli autori è quella "classica" (3.000.000 U s.c. per 3 volte alla settimana per 6-12 mesi) ricavata dall'esperienza maturata nel trattamento dell'epatite HCV-positiva. A differenza di quanto accade nella terapia di tale patologia HCV-correlata, i pazienti con crioglobulinemia mista sono di solito pesantemente sintomatici e l'IFN determina abitualmente un immediato

miglioramento dei sintomi, soprattutto della porpora e delle artralgie, mentre al contrario, i pazienti con l'epatite cronica, che sono completamente asintomatici, sviluppano gli effetti collaterali soggettivi dell'IFN. Per tale motivo, la percentuale di pazienti crioglobulinemici che sospende la terapia con IFN per effetti collaterali soggettivi è bassa, mentre in quelli con l'epatite HCV-positiva è piuttosto elevata.

La risposta primaria all'IFN, definita come scomparsa dei segni clinici della malattia durante il trattamento, varia a seconda dei vari autori e sono riportate percentuali tra il 39 e il 60% (Ferri et al., 1993; Mazzaro et al., 1994; 1996; Dammacco et al., 1994; Casato et al., 1991; Misiani et al., 1994). Anche in questi casi la risposta primaria non è sempre definita in maniera uniforme, ma comunque la percentuale di risposte è soddisfacente.

L'eradicazione dell'HCV, ovvero la scomparsa dell'HCV-RNA, si verifica soltanto in una piccola percentuale di casi (15-20%), e inoltre, alla sospensione del trattamento, la grande maggioranza dei pazienti presenta una recidiva clinica e la ricomparsa dell'HCV-RNA.

Anche se gli effetti collaterali soggettivi dell'IFN sono ben tollerati dai pazienti crioglobulinemici, la terapia comunque determina una serie di effetti collaterali di tipo biologico correlati all'attività anti-proliferativa del farmaco (piastrinopenia, leucopenia) o alla sua azione sul sistema immunitario (tiroiditi autoimmuni, eritemi, etc.) i quali possono determinare la sospensione del trattamento. Non esistono studi pubblicati sull'utilizzo dell'IFN ad alto dosaggio nella CM. Il timore di trattare questo tipo di pazienti con alti dosaggi di IFN è giustificato dalla presenza di una malattia cronica di fegato spesso avanzata, o di leuco-piastrinopenia, o di fenomeni autoimmuni già all'esordio della patologia. Sebbene si affermi che la terapia della CM con l'utilizzo dell'IFN, dia risultati insoddisfacenti, questi risultati sono sovrapponibili a quelli ottenuti nelle epatiti croniche da HCV quando si utilizzava il medesimo basso dosaggio di IFN. Da qualche anno infatti, la terapia delle epatiti da HCV prevede l'utilizzo di IFN ad alto dosaggio o della dose giornaliera, opzioni terapeutiche con le quali si sono state raggiunte guarigioni a lungo termine pari al 30-45%, risultati mai ottenuti nella CM. In effetti un recente studio (Cresta et al., 1999) in cui una ampia serie di pazienti affetti da una malattia cronica di fegato HCV-positiva è stata trattata con il dosaggio di 3 MU per 3 volte alla settimana per 6 mesi, non sono state trovate differenze nella percentuale di risposte nei casi con e senza crioglobuline, sia asintomatici che con la sindrome crioglobulinemica. Questo indica che non vi sono differenze biologiche tra i soggetti crioglobulinemici e quelli non-crioglobulinemici che possano in qualche modo modificare la risposta alla terapia antivirale. E' pertanto probabile che utilizzando dosaggi di IFN più elevati la percentuale di risposte sia decisamente più alta.

Pur considerando che i successi raggiunti con l'IFN sono limitati a un ristretto numero di casi, si deve riconoscere che l'IFN risulta comunque l'unico trattamento in grado di portare alla remissione completa della CM. Se la scomparsa della malattia si ottiene solo nei soggetti che diventano HCV-RNA negativi, è verosimile che l'HCV possa essere considerato l'agente eziologico della malattia. E' stato recentemente dimostrato che la crioglobulinemia mista può essere considerata una malattia monoclonale dei linfociti B sin dall'esordio. Infatti, in passato rilievi clinici avevano

evidenziato l'evoluzione della CM in linfomi e dati istologico-laboratoristici, quali il riscontro di noduli linfoidi nel midollo o di una costante compente monoclonale nel sangue periferico, avevano già fatto supporre che la CM fosse una malattia "benigna" dei linfociti (Ferri et al., 1994). Recenti sviluppi tecnologici hanno consentito di individuare la presenza di una popolazione B-linfocitaria monoclonale in un'alta percentuale di casi di CM di II tipo non solo nel midollo, ma anche nei linfociti del sangue periferico (Ferri et al., 1993). Con tali metodi che utilizzano la biologia molecolare, si è potuto anche dimostrare che non solo i pazienti con crioglobulinemia mista HCV correlata, ma anche il 25% dei soggetti con epatite cronica da HCV possono presentare B-linfociti monoclonali nel sangue periferico, questo indica che l'HCV, con modalità ancora sconosciute, è in grado di determinare una proliferazione monoclonale fin dalle fasi più precoci dell'infezione.

Stante la presenza di tale popolazione di linfociti monoclonali nei soggetti affetti da CM, sembra di notevole importanza la osservazione che, contestualmente all'eradicazione dell'HCV ottenuta mediante terapia con IFN, è stata osservata una regressione della linfoproliferazione monoclonale presente a livello del midollo e del sangue periferico (Mazzaro et al., 1996). Questo infatti può indicare che il disordine monoclonale a cellule B è sostenuto o dalla replicazione cronica dell'HCV o dagli immunocomplessi costituiti dal virus e dagli anticorpi diretti contro di esso, e che se tale stimolazione cronica viene a cessare (mediante l'eradicazione dell'HCV) anche la patologia monoclonale può regredire (Mazzaro et al., 1996). Questo risultato è di particolare importanza in quanto i soggetti con CM spesso evolvono in patologie chiaramente neoplastiche dei B-linfociti, quali i linfomi non-Hodgkin o il morbo di Waldenström. Eliminando la linfoproliferazione monoclonale si elimina anche la possibilità della malattia di trasformarsi in queste patologie ben più severe.

Non vi sono ancora elementi sufficienti per stabilire delle chiare linee guida alla terapia con IFN, ma dagli studi fin qui pubblicati emerge che è opportuno iniziare la terapia negli stadi iniziali (stadio I e II) della sindrome crioglobulinemica, quando cioè la malattia di fegato non è ancora di grado avanzato e la proliferazione B monoclonale è ancora verosimilmente vincolata alla replicazione virale. Al contrario, quando la malattia di fegato è evoluta verso la cirrosi o la CM in un linfoma conclamato, la terapia con IFN risulta inefficace e può risultare perfino dannosa.

Per verificare quali fattori influenzassero la risposta alla terapia con IFN nella CM, abbiamo analizzato, in uno studio effettuato su 42 pazienti trattati con IFN- $\alpha$ 2b 3 MU x 3 volte a settimana per 12 mesi, i fattori predittivi di risposta al trattamento mediante analisi statistica multivariata. Nessuna differenza è stata riscontrata tra i pazienti con risposta completa a lungo termine (6 casi, 14%) e quelli non responsivi o ricaduti (36 casi, 86%), per quanto riguardava l'età, il sesso, la durata di malattia, la severità dei sintomi, i test di funzionalità epatica, i livelli delle immunoglobuline, del fattore reumatoide o del complemento. Al contrario, una bassa probabilità di risposta era invece associata alla presenza di livelli elevati del criocrito (Odds Ratio = 4.72; 95% CI = 0.40-10.92), del genotipo 1b (Odds Ratio = 20.43; 95% CI = 3.61-115.62), di cirrosi epatica (Odds Ratio = infinito) (Mazzaro et al., 1997). Questo studio indica che nella sindrome crioglobulinemica si associano numerosi fattori, e la risposta alla terapia con

IFN dipende da fattori correlati al virus (genotipo 1b) e all'ospite: ovvero alla gravità della malattia epatica (cirrosi) e infine alla massa monoclonale di B-linfociti produttori di crioglobuline (criocrito).

Gli studi finora pubblicati sul trattamento della CM con IFN dimostrano che il numero di pazienti che eliminano il virus e che hanno ottenuto una risposta duratura della CM è molto basso.

Per tali motivi molti pazienti che non hanno risposto al trattamento o che sono ricaduti dopo la terapia con IFN devono essere avviati, se possibile, a terapie di salvataggio, come viene di solito effettuato nei soggetti con epatite C senza crioglobulinemia. Il ritrattamento della CM non è mai stato effettuato con dosi di IFN più elevate delle precedenti per il timore che i soggetti con CM non tollerano dosi elevate di tale farmaco. Anche in un nostro recente studio, effettuato su 28 pazienti non-responders o recidivanti al primo trattamento con IFN, abbiamo utilizzato IFN leucocitario per 12 mesi allo stesso dosaggio di 3 MU x 3 volte a settimana per 12 mesi. Questa terapia ha determinato una risposta a lungo termine in 5 pazienti (18% dei casi). Durante il trattamento con interferon leucocitario non sono stati riscontrati effetti collaterali severi tali da determinare la sospensione del trattamento (Mazzaro et al., 2000). Questo studio indica che anche nei soggetti non responsivi a un primo tentativo terapeutico con IFN è possibile ottenere una risposta duratura mediante l'utilizzo di un IFN diverso dal precedente. Vi è in realtà anche una singola osservazione che indica la guarigione della CM dopo una terapia con IFN ad alto dosaggio dopo il fallimento con il dosaggio standard (Laganovic et al., 2000). Questo indicherebbe che, oltre alla sostituzione del tipo di IFN, anche strategie che prevedono dosaggi di IFN elevati possono essere utilizzate in questi pazienti.

La terapia di combinazione con IFN più Ribavirina, che si è dimostrata di straordinaria efficacia nelle epatiti croniche recidivanti o non responsive al trattamento con il solo IFN, si propone evidentemente anche nella terapia delle crioglobulinemie miste refrattarie alla monoterapia con IFN. Al momento, a parte qualche abstract, non sono stati pubblicati studi clinici controllati su tale strategia terapeutica; esiste al momento un'unico studio di riferimento (Calleja et al., 2000) in cui un numero non elevato (13 casi) di soggetti refrattari al trattamento con IFN in monoterapia, è stato trattato con la terapia di combinazione a dosi standard (1000-1200 mg/die di ribavirina e 3MU per 3 alla settimana di IFN per 12 mesi). I risultati di questa sperimentazione sono comunque incoraggianti in quanto 3 degli 8 pazienti non-responsivi e 4 dei 5 pazienti ricaduti al primo trattamento con IFN da solo, hanno presentato una risposta a lungo termine alla terapia di combinazione. Nella nostra esperienza di 17 casi refrattari a un primo trattamento con IFN è stata osservata al momento una risposta sostenuta in solo 4 casi (24%). Ma il follow-up della nostra casistica è incompleto e una parte dei soggetti non ha ancora concluso la terapia (Gorevic et al., 1980). Nell'insieme, questi dati indicano come la terapia di combinazione si proponga come una valida strategia terapeutica nella CM. L'efficacia della terapia di combinazione con IFN e ribavirina è comprovata nei ritrattamenti, ed è verosimile che il trattamento dei pazienti naïve con la terapia di combinazione, possa dare risultati definitivi in una percentuale maggiore di pazienti.

## Bibliografia

- ABEL, G. Hepatitis C virus infection in type II mixed cryoglobulinemia (review). *Arthritis Rheum* 1993,36: 1341-57.
- AGNELLO, G., CHUNG, R. T., KAPLAN, L.M. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia? *N Engl J Med* 1992,327: 1490-1496.
- BONOMO, L., CASATO, M., AFELTRA, A., *et al.* Treatment of idiopathic mixed cryoglobulinemia with alfa-interferon. *Am J Med* 1987,83: 726-31.
- BROUET, J.C., CLAUVEL, J., DAMON, F., *et al.* Biological and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med* 1974,57: 775-788.
- CALLEJA, J.L., ALBILLOS, A., MORENO OTERO, R., ROSSI, I., CACHO, G., DOMPER, F., *et al.* Sustained response to interferon- or to interferon- plus ribavirin in hepatitis C virus-associated symptomatic mixed cryoglobulinemia *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2000,13: 1179-1186.
- CASATO, M., LAGANA, B., ANTONELLI, G., DIANZANI, F., BONOMO, L. Long-term results of therapy with interferon alfa for type II essential mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1991,78: 3142.
- CRESTA, P., MUSSEET, L., CACOUB, P., FRANGUEL, L., VITOUR, D., POYNARD, T., *et al.* Response to interferon alpha treatment and disappearance of cryoglobulinemia in patients hepatitis C virus. *Gut* 1999,45: 122-8.
- DAMMACCO, F., SANSONNO, D., HAN, J.H., *et al.* Natural interferon-alpha versus its combination with 6-metil prednisolone in the therapy of type II mixed cryoglobulinemia: a long term, randomized, controlled study. *Blood* 1994,84: 3336-43.
- FERRI, C., MONTI, M., LA CIVITA, L., LONGOBARDO, G., GRECO, F., PASERO, G., *et al.* Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1993,82: 3701-4.
- FRANZIN, F., POZZATO, G., EFREMOV, D., *et al.* Clonal B-cell expansions in peripheral blood of HCV-infected patients. *Br J Haematol* 1995,90: 548-52.
- GOREVIC, P.D., KASSAB, H., LEVO, Y., *et al.* Mixed Cryoglobulinemia: clinical aspects and long-term follow-up of 40 patients. *Am J Med* 1980,69: 287-308.
- LAGANOVIC, M., JELAKOVIC, B., KUZMANIC, D., SCUKANEC-SPOLIAR, M., RONCEVIC, T., CUZIC, S., *et al.* Complete remission of cryoglobulinemic glomerulonephritis (HCV-positive) after high-dose interferon therapy. *Wien Klin Wochenschrift* 2000,112: 596-600.
- Lo SPATULLO, J., DORWARD, B., MILLER, W., *et al.* Cryoglobulinemia based on interaction between a macroglobulin and 7S gammaglobulin. *Am J Med* 1962,32: 142-147.
- MAZZARO, C., CARNIELLO, G.S., COLLE, R., DORETTO, P., MAZZI, G., CROVATTO, M., *et al.* Interferon therapy in HCV-positive mixed cryoglobulinemia: viral and host factors contributing to efficacy of the therapy. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997,29: 343-350
- MAZZARO, C., COLLE, R., BARACETTI, S., NASCIMBEN, R., PUSSINI, E., ZORAT, F., *et al.* Effectiveness of Leucoyte Interferon in patients affected by HCV-positive Mixed Cryoglobulinemia resistant to recombinant alpha-Interferon. *Digestive ed Liver disease*, 2000 (in press).
- MAZZARO, C., FRANZIN, F., TULISSI, P., PUSSINI, E., CROVATTO, M., CARNIELLO, G.S., *et al.* Regression of monoclonal B-cell expansion in patients affected by mixed cryoglobulinemia responsive to  $\alpha$ -interferon therapy. *Cancer* 1996,77: 2604-13.
- MAZZARO, C., POZZATO, G., MORETTI, M., *et al.* Long-term effects of alpha interferon therapy for type II mixed cryoglobulinemia. *Haematologica* 1994,79: 342-9.
- MAZZARO, C., SANTINI, G.F., POZZATO, G., *et al.* Clinical and virological findings in mixed cryoglobulinemia. *J Int Med* 1995,238: 153-60.
- MISIANI, R., BELLAVITA, P., FENILI, D., VICARI, A., MARCHESI, D., SIRONI, P.L., *et al.* Interferon alfa-2a therapy in cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus. *N Eng J Med* 1994,330: 751-6.
- MONTEVERDE, A., RIVANO, M., ALLEGRA, G., *et al.* Essential mixed cryoglobulinemia, type II: a manifestation of low- grade malignant lymphoma? Clinical morphological study of 12 cases with special reference to immunohistochemical findings. *Acta Haematol* 1988,79: 20-5.

- MONTEVERDE, A., SABATTINI, E., POGGI, S., *et al.* Bone marrow findings further support the hypothesis that essential mixed cryoglobulinemia type II is characterized by monoclonal B-cell proliferation. *Leukemia Linfo* 1995,20: 1119-24.
- POZZATO, G., MAZZARO, C., CROVATTO, M., *et al.* Low grade malignant lymphoma, hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1994,84: 3047-53.

## **GLOMERULONEFRITE HCV-CORRELATA: STATO DELL'ARTE**

Gabriele Pozzato (a), Cesare Mazzaro (b)

(a) *Dipartimento di Medicina Clinica e Neurologia, Unità Clinico-Operativa Medicina Clinica, Università degli Studi di Trieste, Ospedale di Cattinara, Trieste*

(b) *Terza Divisione di Medicina Generale, Ospedale Civile di Pordenone, Pordenone*

### **Introduzione**

L'interessamento renale nelle malattie croniche di fegato non è presente soltanto all'infezione da virus dell'epatite C (HCV), ma, in tale patologia, esso si manifesta con una prevalenza e una gravità decisamente superiori a quanto si verifica in corso di epatopatia a eziologia differente.

Nel caso di malattia di fegato ad eziologia etanolica, l'interessamento renale si manifesta con una nefropatia da IgA, forma morbosa relativamente mite, che solo raramente assume una gravità tale da diventare clinicamente importante e da condizionare la prognosi del paziente.

Nella malattia di fegato correlata all'infezione da virus dell'epatite B (HBV) sono segnalate, anche se non frequentemente, patologie renali, in particolare la glomerulonefrite membranosa. Tale patologia è di solito una forma secondaria a Lupus Erythematosus Sistemico o, più aspecificamente, a neoplasie. Il virus può determinare la glomerulonefrite per il depositarsi, in sede sottoepiteliale, di complessi antigene-anticorpo a carica cationica costituiti da anticorpi anti-HBe. Il virus sembra in grado di replicarsi nelle cellule renali, in particolare nelle cellule dei tubuli prossimali e dei glomeruli. La prognosi della malattia renale sembra sfavorevole con rapida evoluzione verso l'uremia terminale. La presenza del virus come agente patogenetico della nefropatia è legata alla dimostrazione degli antigeni virali nelle cellule del rene, attraverso una metodica non disponibile in tutti i centri, ma che può essere sostituita dalla dimostrazione della replicazione del virus HBV nel siero (positività dell'HBV-DNA). Se in corso di epatiti da HBV o etanoliche l'interessamento renale è sporadico, nell'infezione da HCV il danno renale rappresenta una problematica di rilievo clinico importante, soprattutto quando l'epatopatia da HCV è associata a crioglobulinemia mista.

### **Epidemiologia**

Non è facile verificare quale sia la frequenza reale di tali patologie in corso di malattia cronica di fegato HCV-positiva. Molti centri hanno pubblicato casistiche affidabili, ma in ogni centro è cruciale il tipo di arruolamento dei pazienti. Infatti, se in un centro nefrologico il rilievo di patologie glomerulari associate all'HCV è raro, e pertanto rappresenta un evento di sicuro impatto emotivo e statistico, nei centri che

arruolano pazienti HCV-positivi, nell'ottica della terapia antivirale, i pazienti con problemi renali vengono scartati a priori (vedi i criteri di inclusione-esclusione dei principali trial clinici sulla terapia con IFN nelle epatiti croniche HCV-positivo). Nel nostro centro, in cui afferiscono principalmente pazienti affetti da crioglobulinemia, è molto frequente l'interessamento renale associato a tale patologia, mentre altre nefropatie glomerulari sono, a dir poco, eccezionali.

Per evidenziare le patologie renali misconosciute nei pazienti HCV-positivi una metodologia affidabile potrebbe essere quella del rilievo autoptico. Uno studio così strutturato è stato effettuato in Giappone, dove in 188 casi di pazienti portatori di malattia di fegato HCV-positiva, venuti a morte per cause dipendenti o indipendenti dalla patologia epatica, è stata esaminata, in corso di autopsia, l'istologia renale (Arase et al. 1998). In tale studio sono stati individuati ben 4 tipi di patologia glomerulare: Glomerulonefriti membrano-proliferative (11% dei casi), Glomerulonefriti membranose (3%), Glomerulonefriti mesangio-proliferative (17%) e infine alterazioni aspecifiche dei glomeruli in ben il 23% dei casi. Da segnalare, però, che solo il 12% dei casi presentava alterazioni degli indici di funzione renale, quale ad esempio una proteinuria significativa e che tutti questi casi erano affetti da glomerulonefrite membrano-proliferativa. Questo studio evidenzia che le alterazioni renali in corso di infezione da HCV sono molto più frequenti di quanto sospettato sulla base dei comuni test di funzione renale. Un elemento nuovo che emerge da questo studio è che la glomerulonefrite membrano-proliferativa, considerata la patologia renale più comune in corso di infezione da HCV, non sembra essere l'unica lesione glomerulare presente, ma l'unica ad essere clinicamente importante. Purtroppo in questo, come in altri studi simili, manca un adeguato gruppo di controllo e pertanto non è possibile un confronto con la prevalenza delle patologie renali nella popolazione generale.

Una differente metodologia per affrontare il problema è stata quella di verificare la prevalenza dell'infezione da HCV in una serie di biopsie renali consecutive eseguite per patologie di ordine nefrologico. Con tale approccio, un recente studio (Fabrizi et al., 1998), eseguito su un'ampia casistica (284 casi di biopsie renali consecutive), ha evidenziato una prevalenza complessiva dell'infezione da HCV pari al 13%. Tale percentuale è molto elevata e significativamente più alta di quella riscontrata nella popolazione generale italiana (circa 3%), anche se manca un gruppo di controllo della medesima area geografica. L'infezione virale è risultata associata nel 100% delle glomerulonefriti crioglobulinemiche, nel 20% delle glomerulonefriti membrano-proliferative e nel 20% di quelle membranose. Con tale differente metodica, le conclusioni sono sostanzialmente analoghe, ovvero si ribadisce un coinvolgimento rilevante del virus nelle patologie renali, in particolare quando si associa a crioglobulinemia mista.

Nella nostra esperienza come centro di riferimento per le crioglobulinemie, la frequenza di patologie renali è del 14.8% (Mazzaro et al., 1999) e ovviamente tutte le patologie renali appartengono alla categoria delle glomerulonefriti membrano-proliferative.

Vi sono interessanti segnalazioni, pur se con casistiche di riferimento piccole e di marginale rilievo epidemiologico, dell'associazione dell'HCV con la glomerulopatia

fibrillare e/o immunotattoidi (Markowitz et al., 1998) e con la rara glomerulosclerosi focale segmentaria (Stehman-Breen et al., 1999).

Da un attento esame delle pubblicazioni in questo campo, si evince che vi sono singolari differenze regionali nella patologia renale associata all'HCV. In effetti, mentre in Europa la patologia più frequente sembra essere la glomerulonefrite crioglobulinemica, negli Stati Uniti (Stehman-Breen et al., 1995) e in Giappone (Okada et al., 1996) prevalgono le glomerulonefriti non-crioglobulinemiche. D'altra parte questa diversa distribuzione della patologia renale rispecchia quanto è stato verificato per la crioglobulinemia mista di II tipo, una complicazione dell'infezione da HCV molto frequente in Italia, Francia e Spagna, ma rara nei paesi anglosassoni e quasi sconosciuta in Giappone.

### **Patogenesi**

Da quanto detto, almeno tre malattie glomerulari sembrano associate all'infezione da HCV:

1. Glomerulonefrite membrano-proliferativa con crioglobulinemia mista
2. Glomerulonefrite membrano-proliferativa senza crioglobulinemia mista
3. Glomerulonefrite membranosa

Le crioglobuline sono immunocomplessi che hanno la caratteristica di precipitare a basse temperature. Un tempo considerata "essenziale" la crioglobulinemia mista è associata all'infezione da HCV in quasi la totalità dei casi. Attualmente è noto che gli immunocomplessi sono costituiti da anticorpi IgG policlonali anti-HCV e da anticorpi IgM monoclonali o policlonali anti-immunoglobuline (fattore reumatoide). A seconda che l'anticorpo IgM sia monoclonale o policlonale la crioglobulinemia si definisce di II o III tipo. La suddivisione non è però così netta in quanto nell'ambito della policlonalità spesso si riconoscono piccole bande monoclonali, e inoltre nel corso degli anni si assiste spesso al passaggio graduale dalla forma di III a quella di II tipo.

La nefrotossicità dell'immunocomplesso IgM-IgG-HCV-RNA sembra dovuta all'alta affinità della componente monoclonale IgM per la fibronectina presente nella matrice mesangiale del glomerulo. Il danno è poi perpetuato e amplificato dai monociti (Roccatello et al., 1993), che, pur in grado di fagocitare gli immunocomplessi, attivano localmente i meccanismi della flogosi rilasciando catepsine e citochine che inducono un danno locale. La presenza di una flogosi è attestata, a livello sistemico, dalla riduzione del complemento totale, ma soprattutto dalla frazione C4, per l'attivazione sia della via classica che di quella alternativa. Tanto più alto è il consumo del complemento, tanto maggiore sarà il grado di formazione di immunocomplessi. Molto recentemente, dato il riscontro di livelli di C4 persistentemente bassi dopo la guarigione della glomerulonefrite ed eliminazione dell'infezione da HCV, si è pensato che in realtà i bassi livelli di C4 siano geneticamente determinati e che siano proprio questi bassi livelli a favorire il danno renale in corso di crioglobulinemia indotta da HCV. Infatti, vi

sono segnalazioni che la delezione del gene per il C4 è un fattore di rischio per lo sviluppo di nefropatia da IgA (Jin et al., 1996) e che la carenza totale di C4 determina ematuria intermittente in assenza di altri fattori di rischio (Lhotta et al., 1996).

L'aspetto istologico renale tipico è quello di una glomerulonefrite membrano-proliferativa di tipo primo, con aspetto "a binario" del glomerulo per il depositarsi di immunocomplessi in sede sottoepiteliale con ispessimento e duplicazione della membrana basale. A questi aspetti, comuni a tutte le nefriti membrano-proliferative, si aggiungono dei reperti tipici delle forme crioglobulinemiche, quali un'infiltrazione mesangiale monocitaria e la presenza di trombi ialini all'interno dei lumi capillari glomerulari legati alla precipitazione degli immunocomplessi circolanti. Al contrario, nella forma di tipo secondo vi sono soltanto depositi densi all'interno della membrana basale. Questi depositi sono costituiti soltanto da C3 nelle forme di tipo II, mentre in quelle di tipo I da C3 e da immunoglobuline. Un altro aspetto tipico delle forme di tipo I è la voluminosità dei depositi sia in sede mesangiale che in sede subendoteliale.

La glomerulonefrite membrano-proliferativa non-crioglobulinemica è associata all'epatite di tipo C più raramente. Anche questa forma trova la sua patogenesi nel depositarsi di immuno-complessi costituiti da IgG-IgM e HCV-RNA. Questi complessi sembrano indurre un certo consumo di complemento, anche se non costantemente, e la frazione C4 non è sempre ridotta come nelle forme associate alle crioglobuline. Dal momento che tale patologia è poco frequente non se ne conosce con precisione l'esatta patogenesi nè l'evoluzione.

Anche la glomerulonefrite membranosa costituisce una rara complicazione dell'infezione da HCV. Dal punto di vista morfologico, le lesioni si presentano alla microscopia ottica come un ispessimento della membrana basale senza evidenza di infiammazione o di proliferazione cellulare. L'immunofluorescenza dimostra che gli ispessimenti sono costituiti da immunoglobuline e complemento (C3 e C5-9). La microscopia elettronica evidenzia depositi densi e irregolari tra la membrana basale e le sovrastanti cellule epiteliali e, tipicamente, "spikes" ovvero spicole irregolari che protrudono sulla membrana basale del glomerulo. Nel tempo questi spikes si ispessiscono formando delle protrusioni a cupola, che finiscono col fondersi tra loro sopra i depositi immuni, includendoli in una membrana irregolarmente e marcatamente ispessita.

Stabilito il coinvolgimento del virus dell'epatite C in queste patologie renali non risulta per nulla chiaro, al contrario, il perché l'infezione in taluni soggetti determini solo una malattia di fegato, in altri una crioglobulinemia mista con o senza l'epatopatia e infine perché, in un ulteriore sottogruppo di soggetti con crioglobulinemia, si verifichi il danno renale.

Dal momento che l'HCV è un virus ad alta variabilità genomica e che sono stati descritti diversi genotipi e sottotipi, risultava attraente l'ipotesi che qualche genotipo virale fosse associato a particolari aspetti clinici dell'infezione da HCV. Questa possibilità è stata esplorata da vari autori e anche i nostri dati (Mazzaro et al. 1999) sono in linea con quanto verificato in altri centri: la distribuzione dei genotipi HCV nei soggetti con malattie renali è sostanzialmente la stessa che si può trovare in soggetti affetti da epatite senza interessamento renale. Nella nostra casistica abbiamo in realtà

riscontrato un lieve aumento della prevalenza del genotipo 1b, che è universalmente riconosciuto come il genotipo HCV più aggressivo. Questa modesta discrepanza può dipendere dal fatto che la nostra casistica presenta un'età media elevata e che molti dei nostri pazienti risultano portatori di cirrosi epatica.

### **Clinica e terapia**

Dal punto di vista clinico, la glomerulonefrite membrano-proliferativa di tipo I è caratterizzata da sindrome nefrosica, ovvero una proteinuria consistente (>4.0 grammi/die), ma talvolta può esordire con una sindrome nefritica o, più raramente, con una ematuria macroscopica. La malattia è capricciosa, è caratterizzata infatti dall'alternarsi di fasi di severissima compromissione della funzione renale e massiva proteinuria a lunghi periodi di remissione della patologia senza necessità di alcuna terapia. La gravità della patologia renale è correlata solo parzialmente a quella della crioglobulinemia associata, non vi è infatti relazione tra la severità della porpora o delle artralgie e la funzione renale, tra questa e la severità della malattia cronica di fegato associata o la neuropatia periferica o la presenza o meno di una sindrome linfoproliferativa cronica.

La malattia, tra riacutizzazioni e remissioni, evolve raramente verso l'insufficienza renale cronica e pertanto la necessità di trattamento dialitico è del tutto eccezionale. Anche se l'evoluzione verso l'uremia è rara, la prognosi di questi pazienti non è comunque buona. Infatti, in un recente studio (Mazzaro et al., 2000a), abbiamo valutato la mortalità di un ampio gruppo di pazienti (132 casi) affetti da crioglobulinemia mista e abbiamo verificato che, nei casi con glomerulonefrite sovrapposta, la sopravvivenza è ridotta e che l'età media di morte è significativamente più bassa. Anche le cause di morte erano diverse: mentre nei soggetti con crioglobulinemia, queste erano in genere correlate alla patologia epatica (encefalopatia, emorragie da rottura di varici etc.), nei soggetti con patologia glomerulare la causa più comune di morte era da ricondurre a processi infettivi, in particolare sepsi. Abbiamo denominato "HCV-RISK" l'associazione tra crioglobulinemia, patologia renale e immuno-soppressione secondaria. Ulteriori casi verificatisi dopo la pubblicazione di tale lavoro ci hanno confermato l'esistenza di tale sindrome come entità nosologica. Non appare chiaro come si instauri questa, non perfettamente definita, immuno-soppressione, che può avere patogenesi differenti. Nella nostra casistica, la maggior parte dei soggetti andata incontro a tale sindrome presentava una crioglobulinemia di tipo II, ovvero con IgM monoclonali, e, con metodiche sofisticate, abbiamo individuato la presenza di una popolazione di linfociti B monoclonali sia nel midollo che nel sangue periferico. Poiché in tutte le patologie B-cellulari associate a produzione di immunoglobuline monoclonali (come ad esempio nel mieloma) si verifica una diminuzione della produzione della normali immunoglobuline policlonali, è verosimile che anche nel contesto della HCV-RISK si verifichi una ridotta produzione, ancora non dimostrata, di immunoglobuline normali.

La terapia della glomerulonefrite membrano-proliferativa era tradizionalmente quella steroidea. Nelle fasi di riacutizzazione della malattia, accanto agli abituali presidi terapeutici della sindrome nefrosica, quali restrizione delle proteine della dieta, ACE-inibitori, diuretici, venivano, e vengono tuttora utilizzate, alte dosi di steroidi per via endovenosa (metilprednisolone 1000 mg per 3 giorni e poi a scalare), mentre la terapia della fase stazionaria prevedeva basse dosi di steroidi (da 0,1 a 0,3 mg/Kg peso al dì) per periodi molto lunghi, se non indefinitivamente. Al momento attuale, dal momento che la malattia renale è associata a una malattia virale cronica, un trattamento steroideo a lungo termine non è assolutamente raccomandabile, anche in considerazione del fatto che è stato dimostrato in maniera inequivocabile un aumento dei livelli di viremia in soggetti con epatite cronica HCV trattati con steroidi per patologie non suscettibili di approcci terapeutici diversi (anemie emolitiche autoimmuni, linfomi, leucemie acute etc.). Al contrario, durante le fasi di riacutizzazione della malattia, gli steroidi ad alto dosaggio sono indispensabili, anche in presenza di una malattia di fegato avanzata.

Poiché la malattia renale è correlata alla deposizione di immunocomplessi, in cui è presente l'HCV-RNA, e, poiché proteine specifiche del virus sono state individuate nei depositi sottoepiteliali glomerulari (Sansonne et al., 1997), sembrava verosimile che si potesse ottenere una diminuzione degli immunocomplessi solo mediante la riduzione delle proteine virali circolanti e dunque mediante una terapia antivirale. Sulla base di queste considerazioni, alcuni autori hanno provato a trattare questi soggetti con alfa-interferon (IFN) ai dosaggi standard di 3.000.000 unità per 3 volte alla settimana. Le prime esperienze in questo tipo di terapia (Misiani et al., 1994) sono state sorprendentemente positive, analogamente a quanto era già stato segnalato nella terapia della crioglobulinemia mista senza patologia renale. Nei soggetti con glomerulonefrite la terapia con IFN è in grado di ridurre e talvolta far sparire la proteinuria, e, parimenti, di migliorare tutti i sintomi correlati alla crioglobulinemia ovvero la porpora, le artralgie e l'astenia. Purtroppo la maggior parte dei sintomi e le alterazioni della funzione renale ritornano ai livelli pre-trattamento alla sospensione del farmaco. Questo indicherebbe che l'IFN fornisce dei risultati di scarso impatto sulla storia naturale della malattia, e solo in una piccola parte di pazienti (10-15%) riesce a eliminare il virus. In questi soggetti, però, non ritornano normali soltanto gli indici di funzione epatica (se alterati all'esordio), ma si normalizza anche la funzione renale con scomparsa della proteinuria (Mazzaro et al., 2000b). Questo indica che la malattia renale è sostenuta dalla replicazione del virus e che lesioni renali non sono irreversibili. Era logico perciò che negli studi più recenti si tentasse di eradicare la malattia virale mediante l'utilizzo di dosaggi di IFN più elevati. Vi sono soltanto segnalazioni sporadiche (Sarac et al., 1997, Laganovic et al., 2000) le quali indicano che dosaggi di IFN elevati sembrano più efficaci dei dosaggi standard, ma è chiaro che l'intensificazione della terapia antivirale sembra raccomandabile nei soggetti non responsivi a un primo tentativo con dosaggi standard. Da qualche anno è inoltre disponibile un nuovo farmaco antivirale, la ribavirina, che, in associazione con l'IFN, ha dimostrato una grandissima efficacia nel trattamento dei soggetti affetti da epatiti croniche HCV-positive resistenti o ricaduti dopo un trattamento con IFN in monoterapia. Poiché la ribavirina non determina importanti effetti collaterali, a parte una moderata e transitoria anemia di tipo emolitico,

al momento attuale, nei soggetti con epatite cronica da HCV non responsiva all'IFN, è più raccomandabile la terapia di combinazione piuttosto che un aumento della dose di IFN. Dal momento che l'efficacia e la sicurezza della terapia di combinazione nella crioglobulinemia mista sono già state verificate (Durand et al., 1998), allo stato attuale delle conoscenze l'associazione dell'IFN con ribavirina sembra il trattamento più efficace anche nella glomerulonefrite crioglobulinemica (Misiani et al., 1999).

## Conclusioni

Le patologie glomerulari sono da sempre considerate malattie irreversibili a eziologia ignota. Da qualche anno, nella glomerulonefrite membranoproliferativa, non solo si è riconosciuto l'agente eziologico, ma anche la sua patogenesi, individuando, su tali basi, una terapia che finalmente supera il classico trattamento immunosoppressivo.

Non tutti concordano sul fatto che la terapia antivirale rappresenti il trattamento ideale della glomerulonefrite in corso di infezione da HCV, sia per l'imprevedibile andamento clinico della malattia, sia per la presenza di numerosi effetti collaterali, sia infine per la mancanza di studi clinici controllati. Sono stati inoltre segnalati casi di peggioramento della funzione renale dopo terapia con IFN (Ohta S., et al. 1999) e pertanto i pazienti sottoposti a tale trattamento vanno attentamente seguiti dal punto di vista internistico.

In conclusione, sebbene ancora pochi pazienti possano trarre vantaggio dalle conoscenze fino ad ora acquisite su questo argomento, è verosimile che, in un futuro prossimo, il migliore controllo della diffusione dell'infezione da HCV, il suo precoce riconoscimento e una efficace e pronta terapia antivirale possano ridurre drasticamente il numero dei soggetti affetti da queste gravi patologie renali.

## Bibliografia

- ARASE, Y., IKEDA, K., MURASHIMA, N. ET AL. Glomerulonephritis in autopsy cases with hepatitis C virus infection. *Intern Med* 1998,37(10): 836-40
- DURAND, J.M., CACOUB, P., LUNEL-FABIANI, F. ET AL Ribavirin in hepatitis C related cryoglobulinemia *J Rheumatol* 1998,25: 1115-7
- LAGANOVIC, M., JELANOVIC, B., KUZMANIC., D. ET AL. Complete remission of cryoglobulinemic glomerulonephritis (HCV-positive) after high dose interferon therapy *Wien Klin Wochenschr* 2000,112(13): 596-600
- LHOTTA, K., NEUHAUSERER, M., SOLDNER, B. ET AL. Recurrent haematuria: a novel clinical presentation of hereditary complete complement C4 deficiency. *Am J Kidney Dis* 1996,27(3): 424-7
- JIN, D.K., KOHSAKA, T., KOO, J.W., HA, I.S., CHEONG, H.I., CHOI Y. Complement 4 locus II gene deletion and DQA1\*0301 gene: genetic risk for IgA nephropathy and Schönlein-Henoch nephritis. *Nephron* 1996,73(3): 390-5
- MARKOWITZ, G.S., CHENG, J.T., COLVIN, R.B., TREBBIN, W.M., D'AGATI, V.D. Hepatitis C viral infection is associated with fibrillary glomerulonephritis and immunotactoid glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 1998,9(12): 2244-52
- MAZZARO, C., ZORAT, F., PANARELLO, G. ET AL. Cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis and hepatitis C virus infection. *It J Gastroenterol Hepatol* 1999,31: 45-53
- MAZZARO, C., PANARELLO, G., TESIO, F. ET AL "HCV-RISK" a hepatitis C virus-related syndrome *J Int Med* 2000,247: 535-45

- MAZZARO, C., PANARELLO, G., CARNIELLO, S. Interferon versus steroids in patients affected by HCV-associated cryoglobulinemic glomerulonephritis *Dig Liver Dis* 2000,32: 176-9
- MISIANI, R., BELLAVITA, P., FENILI, D. ET AL. Interferon alfa-2<sup>o</sup> therapy in cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus. *N Engl J Med* 1994,330: 751-6
- MISIANI, R., BELLAVITA, P., BAIO, P. ET AL. Successful treatment of HCV-associated cryoglobulinaemic glomerulonephritis with combination of interferon- $\alpha$  and ribavirin *Nephrol Dial Transplant* 1999,14: 1558-60
- OHTA, S., YOKOYAMA, H., WADA, T. ET AL. Exacerbation of glomerulonephritis in subjects with chronic hepatitis C virus infection after interferon therapy. *Am J Kidney Dis* 1999,33(6): 1040-8
- OKADA, K., TAKISHITA, Y., SHIMOMURA, H. ET AL. Detection of hepatitis C virus core proteins in the glomeruli of membranous glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 1996,45: 71-6
- ROCCATELLO, D., ISIDORO, C., MAZZUCCO, G. Role of monocytes in cryoglobulinemia-associated nephritis. *Kidney Int* 1993,43: 1150-5
- SANSONNO, D., GESUALDO, L., MANNO, C., SCHENA, F.P., DAMMACCO, F. Hepatitis C virus-related proteins in kidney tissue from hepatitis C virus-infected patients with cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis. *Hepatology* 1997,25(5): 1237-44
- SARAC, E., BASTACKY, S., JOHNSON, J.P. Response to high-dose interferon-alpha after failure of standard therapy in MPGN associated with hepatitis C virus infection. *Am J Kidney Dis* 1997 30(1): 113-5
- STEHMAN-BREEN, C., ALPERS, C.E., COUSER, W.G., WILLSON, R., JOHNSON, R.J. Hepatitis C virus associated membranous glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 1995; 44: 141-7
- STEHMAN-BREEN, C., ALPERS, C.E., FLEET, W.P., JOHNSON, R.J. Focal segmental glomerular sclerosis among patients infected by hepatitis C virus. *Nephron* 1999; 81(1): 37-40

## **INFEZIONE DA HCV E DISORDINI LINFOPROLIFERATIVI**

Anna Linda Zignego (a), Rhimou Riyahi (a), Francesca Giannelli (a), Clodoveo Ferri (b), Paolo Gentilini (a)

(a) *Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Cardiologia, Epatologia ed Oncologia, Università degli Studi di Firenze, Firenze*

(b) *Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Reumatologia, Università degli Studi di Pisa, Pisa.*

La varietà di patologie extraepatiche potenzialmente associate con il virus C dell'epatite (HCV) ha indotto a coniare il termine "malattia da HCV", intendendosi con ciò che tale infezione deve essere interpretata come malattia sistemica, di ampia competenza internistica, piuttosto che malattia di stretta competenza epatologica (1). Nonostante la varietà delle possibili manifestazioni cliniche finali, la patologia extraepatica da HCV trova un motivo unificante nel fatto di riconoscere alla base meccanismi di tipo linfoproliferativo e/o autoimmunitario (1). Alla luce di ciò, la storia naturale dell'infezione da parte di tale virus, ad un tempo epatotropico e linfotropico, può essere sintetizzata come un percorso prevedente due principali "vie", la "via epatica" e la "via linfatica", spesso, ma non necessariamente combinate e possibilmente esitanti, ciascuna, in malignità rispettivamente epatiche o linfatiche. In considerazione del fatto che, a differenza di quella epatica, la via linfatica appare molto varia nelle manifestazioni cliniche finali, appare oggi ovvio che, a prescindere dalle ipotesi interpretative patogenetiche interessanti le diverse manifestazioni cliniche finali (e di volta in volta coinvolgenti in prima linea i settori specialistici relativi), sia necessaria l'indagine sui possibili meccanismi patogenetici a monte possibilmente esplicitanti le ragioni della tendenza di tale infezione a dar luogo a manifestazioni di tipo linfoproliferativo e/o autoimmunitario. A tal fine, particolare interesse suscita lo studio dei disordini linfoproliferativi (DLP) HCV-correlati ed in modo particolare della crioglobulinemia mista (CM), la quale è in assoluto la patologia extraepatica più strettamente connessa con l'infezione ed è allo stesso tempo un disordine anche autoimmune, rappresentando un modello di studio unico nel suo genere.

### **Infezione da HCV e crioglobulinemia mista (CM)**

La CM è senz'altro la manifestazione extraepatica da HCV più documentata ed accertata (2-4). Per le caratteristiche già accennate, può essere definita come il crocevia ideale fra infezione da HCV, disordini autoimmuni e neoplasie B cellulari (5). Si tratta di una malattia da immunocomplessi circolanti (ICC), la cui produzione è secondaria ad un processo linfoproliferativo B-cellulare. La definizione di crioglobulinemia è basata su un dato di laboratorio: la presenza nel siero di una o più immunoglobuline (Ig) caratterizzate

dal fatto di precipitare a temperature al di sotto dei 37°C e di redissolversi dopo il riscaldamento del siero. La crioglobulinemia può essere distinta in tre sottogruppi secondo la classificazione di Brouet et al. (6): tipo I, composto da una Ig monoclonale, tipo II e III (CMII e CMIII), caratterizzati da IgG policlonali ed IgM ad attività di fattore reumatoide, rispettivamente monoclonali e policlonali. La crioglobulinemia di tipo I si trova tipicamente in pazienti con malignità ematologiche, mentre la CM di tipo II o III può essere associata a malattie infettive, neoplastiche o sistemiche varie, ovvero può trovarsi al di fuori di tali condizioni, configurando la cosiddetta CM essenziale (CME). Dopo la scoperta della connessione epidemiologica strettissima fra CME ed infezione da HCV, tale termine ha perso il suo significato. L'esistenza di tale connessione è emersa in modo molto chiaro da studi sia sierologici che molecolari: in primo luogo nei pazienti con CM è stata determinata una prevalenza estremamente alta di marcatori HCV (anti-HCV e/o sequenze HCV) con valori associativi che, a seconda delle casistiche variano da 43% a più del 90% (2, 4, 7, 8). Inoltre anticorpi anti-HCV e/o sequenze HCV RNA sono state trovate concentrate nei crioprecipitati, ovvero nel siero completo rispetto al sopranatante ottenuto dopo crioprecipitazione (4, 7), mentre sequenze virali sono state determinate nelle cellule mononucleate periferiche e midollari nella maggior parte dei pazienti con CM, talora anche in assenza di HCV RNA sierico (9). D'altro canto, studi effettuati in popolazioni non selezionate di pazienti con epatite cronica C, riportano un'alta prevalenza di pazienti con CM, la maggioranza essendo rappresentati da soggetti con sindrome di tipo III e di solito con bassi livelli di crioglobuline e paucità o assenza di sintomi (8, 10). La prevalenza di crioglobuline miste in tali pazienti oscilla fra 19% a più del 50% in studi differenti (8, 11). Nello studio di Lunel et al, 54.3% dei pazienti con epatite C avevano crioglobuline nel siero. In aggiunta a ciò, tali pazienti spesso avevano una cirrosi ed una storia più lunga di epatite rispetto ai controlli (8), suggerendo che la severità del danno epatico possa giocare un ruolo nella patogenesi della forma. Peraltro è oggi accertato che parte dei pazienti con CM, con oscillazioni che vanno dal 25% a più del 50%, mostrano infezione cronica da HCV senza evidenza di danno epatico. Inoltre l'osservazione secondo cui la CM è raramente osservata in pazienti con epatopatie severe non correlate al virus C, indica che non può essere considerata una mera manifestazione extraepatica del danno epatico (12-17). Inoltre è da notare che studi più recenti tenderebbero piuttosto ad associare la presenza di CM con forme più lievi di epatopatia (18). Il coinvolgimento renale, ed in particolare la glomerulonefrite membranosa-proliferativa, rappresenta una delle più severe complicanze della CM e si può osservare in circa la metà dei pazienti. La nefropatia crioglobulinemica può essere correlata con la formazione in situ o la deposizione intraglomerulare di immunocomplessi contenenti HCV. Un'evidenza indiretta di tale tipo di patogenesi della lesione renale è data dall'effetto positivo della plasmaferesi o del trattamento interferonico.

Più in generale, i risultati del trattamento con interferone (IFN) nei pazienti con CM rappresentano una prova indiretta del nesso patogenetico fra CM ed infezione da HCV. Infatti, trials controllati hanno oggi definito l'efficacia dell'IFN alfa nel trattamento della CM. La risposta all'IFN può essere osservata in oltre il 50% dei pazienti ed include il miglioramento della vasculite cutanea e della funzione renale. Tale risposta clinica è

accompagnata da una riduzione della viremia HCV, della concentrazione delle crioglobuline nel siero e della sintesi di FR IgM (3, 19-21). Tuttavia, circa l'80% dei soggetti che rispondono va incontro a una ricaduta sia clinica che biochimica. Inoltre sono da tener presenti i potenziali effetti nocivi del trattamento con IFN, quali un peggioramento o la comparsa "de novo" di forme di neuropatia sensitivo/motoria (22, 23). Inoltre, recentemente sono stati riportati dati a favore dell'utilità dell'introduzione delle ribavirina nel trattamento della CM HCV-correlata in analogia a quanto visto per la semplice epatopatia cronica (24, 25).

Particolare interesse hanno da tempo suscitato osservazioni quali l'espansione clonale di cellule B IgMK-positivo nel sangue periferico, la presenza di aggregati linfoidi midollari e l'infiltrazione linfocitaria del fegato, milza o reni in simili pazienti. Tali dati sono una conferma del carattere linfoproliferativo della CM la quale, in una minoranza di casi e generalmente dopo lunghi periodi di tempo, può evolvere in un franco linfoma non-Hodgkin (LNH) a cellule B. Ci sono molti dati che suggeriscono che la patogenesi della vasculite, che è la caratteristica peculiare delle manifestazioni cutanee e viscerali della CM, sia correlata con la deposizione di complessi immuni circolanti, essenzialmente crioglobuline, tuttavia, il sottostante disordine linfoproliferativo si manifesta in forma di infiltrazione interstiziale linfocitica con un diffuso pattern nodulare e può contribuire di per sé al danno dell'organo interessato.

Da un punto di vista clinico le CM di tipo II e III sono comparabili relativamente al coinvolgimento d'organo e decorso, con l'eccezione della loro possibilità di evolvere verso un franco LNH. Ancora oggi è discusso se tali forme rappresentino patologie completamente diverse ovvero fasi evolutive di uno stesso processo. Sarebbero nella direzione di tale seconda ipotesi i risultati da noi recentemente ottenuti (vedi oltre). In accordo con tale impostazione di pensiero la CM di tipo III potrebbe evolvere verso un disordine linfoproliferativo benigno con componente IgM monoclonale, la CM di tipo II, la quale costituirebbe una situazione prelinfomatosa che in alcuni individui potrebbe evolvere fino ad un franco linfoma a cellule B, di solito dopo un lungo periodo di tempo (26, 27).

### **Infezione da HCV e linfoma**

Si possono distinguere fondamentalmente due categorie di neoplasie linfatiche HCV-associate: quelle osservate nel corso dell'evoluzione di una CM e quelle idiopatiche. Per quanto concerne la prima categoria, nella nostra esperienza è stato visto che 14/200 pazienti con CM avevano sviluppato un franco LNH a cellule B dopo un lungo periodo dalla diagnosi di malattia (4, 23). La stessa età elevata di tali pazienti suggeriva un'infezione di lunga data. Altri studi hanno mostrato anche un'alta prevalenza di aspetti midollari di tipo linfomatoso in pazienti con CM/HCV di tipo II. Ad esempio, nello studio di Pozzato e collaboratori, più del 38% dei campioni midollari mostrava evidenza di un linfoma a basso grado (15); nello studio canadese di Rasul e collaboratori, 4/16 pazienti (25%) con CM HCV-correlata avevano aspetti morfologici

midollari consistenti con un LNH a cellule B (28). In questi due studi ed in altri veniva anche osservata evidenza di un'espansione monoclonale di cellule B tramite analisi molecolari e/o di citometria di flusso. Più recentemente, sulla scorta dei reperti istopatologici e clinici osservabili in presenza di infezione cronica da HCV, è stata introdotta un nuovo inquadramento classificativo delle proliferazioni linfoidi clonali HCV-correlate che distingue due principali gruppi: i disordini linfoproliferativi monotipici di significato indeterminato (MLDUS) e i linfomi franchi (5). Di questi due gruppi i primi non possono essere riconosciuti senza dati clinici in quanto il loro aspetto istopatologico è fondamentalmente indistinguibile da quello di alcuni tumori linfoidi, che sono indolenti, ma ciononostante invariabilmente fatali. Con più dettaglio, gli MLDUS sono più frequentemente rinvenuti in soggetti HCV-positivi con quadro clinico e bioumorale di CM di tipo II. Istologicamente, seguendo la classificazione REAL, tali soggetti hanno infiltrati linfoidi midollari ed epatici che assomigliano ai linfomi linfocitici (a piccoli linfociti)/leucemia linfatica cronica a cellule B (B-CLL) ovvero all'immunocitoma/linfoma linfoplasmacitico (Ic). Per quanto concerne la determinazione di un'espansione clonale in tali forme, studi recenti effettuati con tecniche molto sensibili porterebbero a dimostrare la presenza di un' oligoclonalità a livello degli infiltrati linfoidi portali di modo che il pattern monotipico individuabile con l'immunoistochimica rifletterebbe più di un clone. Una gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS) è stata diagnosticata in un'alta prevalenza di pazienti HCV-positivi senza crioglobulinemia (29). In una minoranza di casi la presenza di componenti midollari monoclonali riflettevano un mieloma franco. Tali casi di MGUS in soggetti HCV-positivi differivano dagli MLDUS per le caratteristiche del pattern istologico, la frequente assenza di crioglobulinemia ed il tipo di componente M nel siero (5, 29)

Sebbene le prime osservazioni di un'associazione statisticamente significativa fra LNH "idiopatico" e l'infezione da HCV in pazienti italiani ed europei sia stata successivamente confortata da studi americani e giapponesi (30-32), il ruolo causale dell'HCV è ancora oggi oggetto di discussione. Nella nostra esperienza, in un primo studio effettuato su una popolazione di soli 50 pazienti con NHL, la prevalenza di infezione risultava intorno al 30% (30). In uno studio successivo effettuato su una popolazione tre volte superiore di soggetti consecutivamente reclutati al momento della prima diagnosi di LNH, la percentuale di pazienti con almeno un indice sierologico e/o tissutale di infezione (anti-HCV, HCV RNA) era intorno al 25% (33). Era anche possibile, seppur raramente, individuare l'infezione solo a livello linfatico (cellule periferiche o midollari) e determinare a livello delle cellule linfatiche tipi virali non determinabili come viremia. Considerando complessivamente la letteratura sull'argomento sino ad oggi, si può notare come la maggioranza degli studi disponibili riportino, anche se con variazioni di prevalenze, il rilievo di una prevalenza maggiore di infezione HCV nei pazienti con LNH a cellule B che nelle popolazioni di controllo. Esistono peraltro ampie variazioni nelle prevalenze nonché vari dati discordanti provenienti soprattutto da regioni del nord Europa ed America (34, 35). Tale chiaro gradiente sud/nord nelle prevalenze ricorda quello già osservato negli studi indaganti

l'associazione fra HCV ed epatite autoimmune e suggerisce fortemente l'importanza condizionante di fattori di tipo costituzional/genetico o ambientale.

Seguendo la classificazione REAL, tali linfomi "idiopatici" comprendono sia B-CLL, Ic, linfomi a cellule B "marginal zone" (nodali, extra-nodali o del tipo MALT, splenici), centrollicolari, linfomi "diffusi a grandi cellule" B che mielomi multipli; fra questi il più frequente risulterebbe il tipo centrollicolare (36). Pure frequenti sarebbero anche i linfomi a cellule B "marginal zone" (36-38). Tutto considerato, le caratteristiche clinico/patologiche dei linfomi associati sino ad oggi con l'infezione da HCV risultano varie; l'unico dato su cui esiste accordo essendo rappresentato dal fatto che si tratta sempre di forme a cellule B.

### **Fattori potenzialmente implicati nella patogenesi dei disordini linfoproliferativi associati all'infezione da HCV**

Le cause che possono spingere la storia naturale dell'infezione da HCV ad imboccare la "via linfatica" rimangono a tutt'oggi oscure e fonte di molte ipotesi interpretative. E' prevedibile peraltro che intervengano una varietà di fattori, inerenti sia l'ospite che il virus che l'ambiente in varia combinazione ed includenti la riattivazione di altri virus linfotropici e fattori ambientali, così come una particolare reattività dell'ospite geneticamente condizionata.

Per quanto concerne la prima ipotesi, sino ad oggi non esistono dati concreti a favore di un ruolo cooperativo esercitato dalla coinfezione da parte dell'HCV e di altri virus linfotropici potenzialmente connessi con la patogenesi di DLP nell'uomo (39, 40). Tuttavia recenti studi indicanti il possibile ruolo enhancer svolto dall'infezione da EBV (ed in particolare dalla sua proteina EBNA-1: Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1), suggeriscono l'opportunità di un'approfondimento delle indagini (41).

Antigeni virali e/o autoantigeni HCV-indotti possono rappresentare uno stimolo cronico per il sistema immunitario, tuttavia possono anche essere coinvolti fenomeni del tipo mimicria molecolare. Tale ipotesi sarebbe suggerita dalla presenza di anticorpi anti-LAG3 (vedi oltre) o anti-GOR. Questi ultimi sono autoanticorpi cross-reattivi specifici sia per la proteina del core virale che per un antigene nucleare chiamato GOR. Tuttavia, il ruolo patogenetico, se alcuno, di tali autoanticorpi rimane da chiarire. Infine è da tener presente che è stato anche proposto il ruolo di particolari alplotipi HLA (42).

Una possibile chiave per l'interpretazione della patogenesi dei disordini extraepatici HCV-correlati, deriva dagli studi virologici dimostranti il linfotropismo del virus C (43-45). Infatti, poiché la maggior parte delle manifestazioni extraepatiche dell'HCV sono di natura autoimmunitaria/linfoproliferativa, appare ovvio supporre che un fattore influenzante il loro sviluppo possa essere tale prerogativa virale (1, 4). E' stato così suggerito che l'infezione delle cellule linfocitarie sia di fatto l'evento innescante, più o meno direttamente, la linfoproliferazione poli- o monoclonale a sua volta responsabile per la produzione dei diversi autoanticorpi, includenti FR ed immunocomplessi circolanti. E' stato anche suggerito che l'infezione diretta di specifiche popolazioni

cellulari possa giocare un ruolo nel determinare talune manifestazioni cliniche quali quelle interessanti i reni e le ghiandole salivari (46).

L'ipotesi di un ruolo chiave giocato dal linfotropismo virale nella patogenesi delle manifestazioni extraepatiche da HCV è stata inizialmente supportata dall'osservazione della frequenza elevata dell'infezione di cellule linfatiche, periferiche o midollari, in tali situazioni (4, 9). La dimostrazione recente di un tropismo virale almeno preferenziale, se non esclusivo, per le cellule B varrebbe indirettamente da supporto a tale ipotesi. Tuttavia, i meccanismi tramite cui un'infezione delle cellule può esitare in DLP non sono ancora completamente delucidati. Di fatto sono oggi disponibili solo dati limitati a favore dell'esistenza di un legame diretto fra l'infezione HCV delle cellule linfatiche e la determinazione di tali fenomeni. Fra questi lo studio di Mecchia et al. (47) offre un meccanismo ipotetico attraverso cui l'infezione delle cellule linfatiche può portare a disordini autoimmunitari. Tali autori hanno analizzato pazienti con CM HCV-correlata ed hanno dimostrato l'esistenza di IgM caratteristiche della malattia e specifiche per un epitopo criptico della proteina LAG-3. Un fenomeno simile è stato determinato in corso di infezione da HIV, dove è possibile osservare la comparsa di una risposta autoimmune verso un epitopo criptico della proteina CD4 a sua volta secondario ad una processazione anomala di tale proteina da parte delle cellule T infettate. Nel caso della CM da HCV l'ipotesi più probabile per spiegare il fenomeno osservato sarebbe ammettere che l'infezione delle cellule linfatiche, particolarmente massiccia in corso di CMII/HCV, sia responsabile di una processazione abnorme della LAG-3 con conseguente presentazione di epitopi normalmente nascosti al sistema immunitario.

Per quanto concerne più specificatamente il rapporto fra infezione da HCV di cellule linfatiche e comparsa di DLP, risultano interessanti i dati ottenuti a seguito dell'inoculazione di cellule mononucleate umane in topi con immunodeficienza combinata severa (topi SCID). Di fatto, l'inoculazione di cellule linfatiche provenienti dal sangue periferico o midollare di soggetti con infezione HCV e manifestazioni cliniche diverse, oltre a confermare la possibilità del virus di infettare, replicare e persistere a lungo entro le cellule linfatiche umane, sembrano mostrare come proprio le cellule derivate da soggetti con manifestazioni linfoproliferative conclamate siano quelle in cui è possibile determinare i livelli più elevati e persistenti di replicazione, con comparsa accelerata di tumori linfatici nell'animale e possibilità di passaggio seriale di cellule infettate in topi diversi (48 e Bronowicki et al., comunicazione personale). Risulta interessante inoltre l'osservazione per cui, nei linfonodi di soggetti con CM HCV-correlata, il core virale e le proteine NS3 ed NS4 siano risultate determinabili nelle cellule linfoidee e nelle aree interfollicolari e nelle PBMC del sangue dei vasi capsulari, suggerendo che l'infezione da HCV preceda la trasformazione neoplastica (49). Inoltre appare di rilievo l'osservazione dell'associazione fra infezione di elementi B ed espansione clonale delle stesse con coinvolgimento soprattutto di cellule produttrici FR IgM, come suggerirebbero taluni risultati ricavati dall'indagine in colture a breve termine di cellule dell'infiltrato intraepatico di pazienti con infezione cronica da HCV (con o senza CM) (50).

Più di recente, dati interessanti sono derivati da studi concernenti il possibile ruolo critico giocato da un'alterazione dei meccanismi che controllano la morte cellulare programmata (PCD o apoptosi) delle cellule linfatiche associata con l'infezione da HCV. Infatti, la caratterizzazione dei DLP più sicuramente HCV-correlati, classificabili oggi come MLDUS (vedi sopra), mostra che si tratta tipicamente di processi clinicamente indolenti a lungo decorso, caratterizzati da una bassa attività replicativa cellulare degli elementi infiltranti il midollo e il fegato e spesso con un'esuberante espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 (5). Come già accennato inoltre tali processi sembrerebbero sostenuti da un'espansione non già mono-, ma piuttosto oligoclonale delle cellule B infiltranti (5). In complesso tali dati suggeriscono che i DLP HCV-correlati possano vedere come elemento importante nella loro patogenesi meccanismi di inibizione della PCD delle cellule B con conseguente progressivo accumulo di cellule linfatiche. Tale interpretazione sarebbe anche in accordo con il tipico intersecarsi di fenomeni autoimmunitari e linfoproliferativi osservati in tali forme. I DLP HCV-correlati, che possono variare da forme di espansione B-cellulare benigna al linfoma maligno, vanno interpretati come processi multifasici in cui sono verosimilmente necessarie varie aberrazioni genetiche in successione. Come già precedentemente notato, i DLP HCV-correlati sopravvivono tipicamente dopo un'infezione cronica di lunga durata. Durante tale lungo periodo è verosimile che sopraggiungano aberrazioni cromosomiche. Ad oggi esistono constatazioni a favore dell'ipotesi che l'infezione da HCV possa influenzare oncogeni associati con DLP. In particolare, è stato osservato che l'evenienza del riarrangiamento del protooncogene anti-apoptotico bcl-2 è più frequente in corso di infezione cronica da HCV e specialmente nei casi evoluti in una CM, cioè nel prototipo dei DLP HCV-correlati. Tale osservazione, effettuata inizialmente in una ristretta popolazione di pazienti (51) e quindi confermata e precisata nelle sue caratteristiche in popolazioni più ampie con l'ausilio di metodiche di biologia molecolare per la determinazione del riarrangiamento genomico e dell'espressione dell'oncoproteina BCL-2 a livello di cellule B periferiche (MBR bcl-2/JH PCR, immunoblot e sequenziamento diretto) (52 e Zignego et al, dati sottoposti per pubblicazione), ha ricevuto del tutto recentemente una conferma in uno studio effettuato con diverse metodologie (53). In breve, il riarrangiamento bcl-2, specifico per le cellule B, comporta l'overespressione della corrispondente proteina anti-apoptotica, con conseguente estensione della sopravvivenza cellulare. Tale ricombinazione, nota anche come traslocazione reciproca t(14;18), sopravviene durante le fasi precoci della differenziazione della cellula B (soprattutto nello stadio di cellula pro-B). E' oggi interpretata come un errore della fisiologica ricombinazione V(D)J, errore che sarebbe favorito da condizioni di stimolazione particolarmente intensa e protratta del compartimento immunitario. La traslocazione t(14;18) è da tempo nota come la più frequente ricombinazione genetica osservabile nei linfomi umani e soprattutto in quelli di tipo follicolare (situazione in cui rappresenta l'hallmark citogenetico) ed è considerata un elemento patogenetico importante nella linfomagenesi, pur non rappresentando, di per sé, un marcatore di neoplasia in atto, ma piuttosto un fattore predisponente i DLP, potenzialmente riscontrabile anche in individui senza evidenza di malattia

linfoproliferativa. In sintesi, in considerazione del ruolo della proteina Bcl-2 nel controllo negativo dell'apoptosi, può essere ipotizzato che un'iniziale linfoproliferazione policlonale possa eventualmente dare origine all'emergenza di un clone protetto dall'apoptosi che, a seguito di eventi mutazionali aggiuntivi, possa evolvere verso una franca malignità (1). Allo stesso tempo, la protezione abnorme dall'apoptosi può predisporre al manifestarsi di disordini autoimmunitari e rappresentare uno dei possibili meccanismi con cui l'infezione da HCV può persistere tanto a lungo nell'ospite. Nella spiegazione della frequenza di tale riarrangiamento genico in corso di infezione da HCV, può essere di aiuto la stimolazione cronica del sistema immunitario da parte di un virus così variabile e per di più infettante le stesse cellule B. Un ruolo di rilievo peraltro potrebbe essere giocato dal binding fra la proteina E2 dell'HCV e la molecola CD81 (54). La molecola CD81 (TAPA-1) è infatti una tetraspanina presente su vari tipi cellulari e particolarmente ben caratterizzata a livello delle cellule B, dove viene a far parte di un complesso molecolare attivatore in grado di abbassare significativamente la soglia di stimolazione delle cellule stesse ad epitopi specifici, con conseguente incremento significativo della frequenza degli eventi ricombinazionali V(D)J a livello dei centri germinativi. Pertanto è verosimile che l'interazione HCV-CD81 possa a un tempo favorire la comparsa di t(14;18) e rendere conto di una protratta attivazione policlonale delle cellule B. In tale ottica, la linfomagenesi da HCV potrebbe rappresentare un modello nel suo genere unico in cui si vedono combinati l'inibizione dell'apoptosi della cellula B e un protratto stimolo proliferativo (55). La nostra più recente osservazione di una regressione dei cloni B cellulari traslocati a seguito di trattamento antivirale efficace è pure in accordo con tale ipotesi interpretativa e suggerisce interessanti analogie con la linfomagenesi da altri agenti infettivi, quali l'*Helicobacter pylori* o l'HIV.

Infine, allo stato attuale delle conoscenze non è possibile escludere che, in analogia con altri virus utilizzando vari meccanismi anti-apoptotici allo scopo di favorire la sopravvivenza delle cellule infettate, l'HCV, in quanto linfotropico e soprattutto coinvolto nell'infezione degli elementi B del sistema linfatico, non utilizzi anche mezzi più diretti per inibire la PCD delle cellule infettate, per esempio attraverso l'azione di una o più proteine virali sui meccanismi regolanti la morte programmata cellulare (56).

In sintesi, la disamina dei dati esistenti porterebbe ad ipotizzare che l'infezione da HCV, con la cooperazione di fattori diversi inerenti l'ospite e l'ambiente o il virus in varia combinazione, possa talora essere responsabile di una disregolazione dei fisiologici processi apoptotici regolanti l'omeostasi del sistema immunitario, con persistenza abnorme di cloni linfocitari. Questo a sua volta potrebbe favorire, sia la determinazione di fenomeni di tipo autoimmunitario, che la sovrarmissione di eventi mutazionali di tipo oncogenico, con il possibile passaggio per tappe successive da un processo linfoproliferativo "torbido" o benigno, quali la CMII, ad una linfoproliferazione decisamente neoplastica quale il LNH franco.

In conclusione i dati esistenti suggeriscono che l'infezione da HCV agisca in uno stadio "remoto" della patogenesi delle differenti manifestazioni linfoproliferative, probabilmente inducendo una generica tendenza al loro sviluppo attraverso un'azione primaria sul sistema immunitario. Sulla base di questa predisposizione virus-correlata, le

manifestazioni cliniche finali potrebbero variare ampiamente nei vari soggetti a seconda di fattori costituzionali e/o ambientali individuali. In altre parole, sulla base di meccanismi patogenetici remoti comuni, in ciascun tipo di DLP HCV-correlato diversi percorsi patogenetici “prossimi”, ad esempio implicanti la produzione di particolari FR IgM, l’intervento di fattori locali e via dicendo, potrebbero portare alla piena comprensione di tali disordini. Del resto, la correlazione esistente fra infezioni ed alterazioni del sistema immunitario è ben nota così come la coesistenza di disordini autoimmuni in pazienti con disordini linfoproliferativi. Infatti, in pazienti con neoplasie a cellule B, quali le gammopatie monoclonali, la leucemia linfatica cronica ed i linfomi di basso grado, possono essere osservati autoanticorpi e/o immunocomplessi, spesso associati con manifestazioni cliniche di tipo immunitario ed anche in tali condizioni sono spesso determinabili nel siero FR monoclonali (IgMk).

La CM, e cioè la sindrome linfoproliferativa più tipicamente associata all’infezione da HCV, è un modello unico nel suo genere che suggerisce l’esistenza di un continuum fra infezione cronica da virus C e disordini autoimmuni e/o linfoproliferativi ad esso correlati.

## Bibliografia.

1. ZIGNEGO, AL, BRECHOT, C. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *J Hepatol* 1999,31(2): 369-76.
2. MISIANI, R, BELLAVITA, P, FENILI, D, BORELLI, G, MARCHESI, D, MASSAZZA, M, VENDRAMIN, G, COMOTTI, B, TANZI, E, SCUDELLER, G, ET AL. Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med* 1992,117(7): 573-7.
3. FERRI, C, MARZO, E, LONGOMBARDO, G, LOMBARDINI, F, LA CIVITA, L, VANACORE, R, LIBERATI, AM, GERLI, R, GRECO, F, MORETTI, A, ET AL. Interferon-alpha in mixed cryoglobulinemia patients: a randomized, crossover-controlled trial. *Blood* 1993,81(5): 1132-6.
4. ZIGNEGO, AL, FERRI, C, GIANNINI, C, LA CIVITA, L, CARECCIA, G, LONGOMBARDO, G, BELLESI, G, CARACCILOLO, F, THIERS, V, GENTILINI, P. Hepatitis C virus infection in mixed cryoglobulinemia and B-cell non- Hodgkin's lymphoma: evidence for a pathogenetic role. *Arch Virol* 1997,142(3): 545-55.
5. FERRI, C, PILERI, S, ZIGNEGO, AL. Hepatitis C virus infection and non-Hodgkin's lymphoma. In: GEODERT, J, (NIH), NCI., editors. Infectious causes of cancer. Targets for intervention. Totowa, New Jersey: The Human Press inc., 2000. p. 349-68.
6. BROUET, JC, CLAUVEL, JP, DANON, F, KLEIN, M, SELIGMANN, M. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med* 1974,57(5): 775-88.
7. AGNELLO, V, CHUNG, RT, KAPLAN, LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia [see comments]. *N Engl J Med* 1992,327(21): 1490-5.
8. LUNEL, F, MUSSET, L, CACOUB, P, FRANGEUL, L, CRESTA, P, PERRIN, M, GRIPPON, P, HOANG, C, VALLA, D, PIETTE, JC, ET AL. Cryoglobulinemia in chronic liver diseases: role of hepatitis C virus and liver damage [published erratum appears in *Gastroenterology* 1995 Feb;108(2):620]. *Gastroenterology* 1994,106(5): 1291-300.
9. FERRI, C, MONTI, M, LA CIVITA, L, LONGOMBARDO, G, GRECO, F, PASERO, G, GENTILINI, P, BOMBARDIERI, S, ZIGNEGO, AL. Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1993,82(12): 3701-4.

10. PAWLITSKY, JM, ROUDOT-THORAVALE, F, SIMMONDS, P, MELLOR, J, BEN YAHIA, MB, ANDRE, C, VOISIN, MC, INTRATOR, L, ZAFRANI, ES, DUVAL, J, ET AL. Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes. *Ann Intern Med* 1995,122(3): 169-73.
11. WONG, VS, EGNER, W, ELSEY, T, BROWN, D, ALEXANDER, GJ. Incidence, character and clinical relevance of mixed cryoglobulinaemia in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 1996,104(1): 25-31.
12. FERRI, C, ZIGNEGO, AL, LONGOMBARDO, G, MONTI, M, LA CIVITA, L, LOMBARDINI, F, GRECO, F, MAZZONI, A, PASERO, G, GENTILINI, P, ET AL. Effect of alpha-interferon on hepatitis C virus chronic infection in mixed cryoglobulinemia patients. *Infection* 1993,21(2): 93-7.
13. CACOUB, P, FABIANI, FL, MUSSET, L, PERRIN, M, FRANGEUL, L, LEGER, JM, HURAUX, JM, PIETTE, JC, GODEAU, P. Mixed cryoglobulinemia and hepatitis C virus. *Am J Med* 1994,96(2):124-32.
14. BALLARE, M, AIROLDI, G, BRUNETTO, MR, MANZINI, P, BORDIN, G, TOUSCOZ, A, BONINO, F, MONTEVERDE, A. Hepatitis C virus infection in type II essential mixed cryoglobulinemias. *Arch Virol Suppl* 1993,8:113-21.
15. POZZATO, G, MAZZARO, C, CROVATTO, M, MODOLO, ML, CESELLI, S, MAZZI, G, SULFARO, S, FRANZIN, F, TULISSI, P, MORETTI, M, ET AL. Low-grade malignant lymphoma, hepatitis C virus infection, and mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1994,84(9):3047-53.
16. ZIGNEGO, AL, FERRI, C, GIANNINI, C, MONTI, M, LA CIVITA, L, CARECCIA, G, LONGOMBARDO, G, LOMBARDINI, F, BOMBARDIERI, S, GENTILINI, P. Hepatitis C virus genotype analysis in patients with type II mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med* 1996,124(1 Pt 1): 31-4.
17. FERRI, C, LONGOMBARDO, G, LA CIVITA, L, GRECO, F, LOMBARDINI, F, CECCHETTI, R, CAGIANELLI, MA, MARCHI, S, MONTI, M, ZIGNEGO, AL, ET AL. Hepatitis C virus chronic infection as a common cause of mixed cryoglobulinaemia and autoimmune liver disease. *J Intern Med* 1994,236(1):31-6.
18. AGNELLO, V. Hepatitis C virus infection and type II cryoglobulinemia: an immunological perspective [published erratum appears in *Hepatology* 1998 Mar;27(3):889]. *Hepatology* 1997,26(6): 1375-9.
19. MISIANI, R, BELLAVITA, P, FENILI, D, VICARI, O, MARCHESI, D, SIRONI, PL, ZILIO, P, VERNOCCHI, A, MASSAZZA, M, VENDRAMIN, G, ET AL. Interferon alfa-2a therapy in cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus [see comments]. *N Engl J Med* 1994,330(11): 751-6.

20. MAZZARO, C, CARNIELLO, GS, COLLE, R, DORETTO, P, MAZZI, G, CROVATTO, M, SANTINI, G.F, TULISSI, P, GREGORETTI, M, MAZZORAN, L, RUSSO, A, SILVESTRI, F, POZZATO, G. Interferon therapy in HCV-positive mixed cryoglobulinaemia: viral and host factors contributing to efficacy of the therapy [see comments]. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997,29(4): 343-50.
21. MAZZARO, C, FAELLI, A, BARACETTI, S, MEZZORAN, L, PUSSINI, E, ZORAT, F, POZZATO, G. Recovery from hepatitis C virus-positive cryoglobulinaemic glomerulonephritis after interferon therapy. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999,31(7): 601-3.
22. FERRI, C, LA CIVITA, L, FAZZI, P, PASERO, G, ZIGNEGO, A.L. Polymyositis, lung fibrosis, and cranial neuropathy in a patient with hepatitis C virus infection [letter; comment]. *Arthritis Rheum* 1996, 39(6):1074-5.
23. LA CIVITA, L, ZIGNEGO, AL, BERNACCHI, E, MONTI, M, FABBRI, P, FERRI, C. Hepatitis C virus infection and cutaneous vasculitis in mixed cryoglobulinemia [letter; comment]. *Mayo Clin Proc* 1996, 71(1):109-10.
24. ZUCKERMAN, E, KEREN, D, SLOBODIN, G, ROSNER, I, ROZENBAUM, M, TOUBI, E, SABO, E, TSYKOUNOV, I, NASCHITZ, JE, YESHURUN, D. Treatment of refractory, symptomatic, hepatitis C virus related mixed cryoglobulinemia with ribavirin and interferon-alpha [In Process Citation]. *J Rheumatol* 2000, 27(9):2172-8.
25. CALLEJA, JL, ALBILLOS, A, MORENO-OTERO, R, ROSSI, I, CACHO, G, DOMPER, F, YEBRA, M, ESCARTIN, P. Sustained response to interferon-alpha or to interferon-alpha plus ribavirin in hepatitis C virus-associated symptomatic mixed cryoglobulinaemia. *Aliment Pharmacol Ther* 1999,13(9): 1179-86.
26. FERRI, C, MONTI, M, LA CIVITA, L, CARECCIA, G, MAZZARO, C, LONGOMBARDO, G, LOMBARDINI, F, GRECO, F, PASERO, G, BOMBARDIERI, S, ET AL. Hepatitis C virus infection in non-Hodgkin's B-cell lymphoma complicating mixed cryoglobulinaemia. *Eur J Clin Invest* 1994,24(11): 781-4.
27. LA CIVITA, L, ZIGNEGO, AL, MONTI, M, LONGOMBARDO, G, PASERO, G, FERRI, C. Mixed cryoglobulinemia as a possible preneoplastic disorder. *Arthritis Rheum* 1995,38(12):1859-60.
28. RASUL, I, SHEPHERD, FA, KAMEL-REID, S, KRAJDEN, M, PANTALONY, D, HEATHCOTE, EJ. Detection of occult low-grade b-cell non-Hodgkin's lymphoma in patients with chronic hepatitis C infection and mixed cryoglobulinemia [see comments]. *Hepatology* 1999,29(2): 543-7.
29. ANDREONE, P, ZIGNEGO, AL, CURSARO, C, GRAMENZI, A, GHERLINZONI, F, FIORINO, S, GIANNINI, C, BONI, P, SABATTINI, E, PILERI, S, TURA, S, BERNARDI, M. Prevalence of monoclonal gammopathies in patients with hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 1998,129(4): 294-8.
30. FERRI, C, CARACCILO, F, ZIGNEGO, AL, LA CIVITA, L, MONTI, M, LONGOMBARDO, G, LOMBARDINI, F, GRECO, F, CAPOCHIANI, E, MAZZONI, A., ET AL. Hepatitis C virus infection in patients with non-Hodgkin's lymphoma [see comments]. *Br J Haematol* 1994,88(2): 392-4.
31. IZUMI, T, SASAKI, R, TSUNODA, S, AKUTSU, M, OKAMOTO, H, MIURA, Y. B cell malignancy and hepatitis C virus infection. *Leukemia* 1997,11 Suppl 3: 516-8.
32. ZUCKERMAN, E, ZUCKERMAN, T, LEVINE, AM, DOUER, D, GUTEKUNST, K, MIZOKAMI, M, QIAN, DG, VELANKAR, M, NATHWANI, BN, FONG, TL. Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma [see comments]. *Ann Intern Med* 1997,127(6): 423-8.
33. ZIGNEGO, AL, FERRI, C, INNOCENTI, F, GIANNINI, C, MONTI, M, BELLESI, G, GENTILINI, P. Lack of preferential localization of tumoral mass in B-cell non- Hodgkin's lymphoma associated with hepatitis C virus infection [letter]. *Blood* 1997,89(8): 3066-8.

34. BRIND, AM, WATSON, JP, BURT, A, KESTEVAN, P, WALLIS, J, PROCTOR, SJ, BASSENDINE, M.F. Non-Hodgkin's lymphoma and hepatitis C virus infection. *Leuk Lymphoma* 1996,21(1-2):127-30.
35. COLLIER, JD, ZANKE, B, MOORE, M, KESSLER, G, KRAJDEN, M, SHEPHERD, F, HEATHCOTE, J. No association between hepatitis C and B-cell lymphoma [see comments]. *Hepatology* 1999,29(4):1259-61.
36. LUPPI, M, LONGO, G, FERRARI, MG, BAROZZI, P, MARASCA, R, MORSELLI, M, VALENTI, C, MASCIA, T, VANDELLI, L, VALLISA, D, CAVANNA, L, TORELLI, G. Clinico-pathological characterization of hepatitis C virus-related B- cell non-Hodgkin's lymphomas without symptomatic cryoglobulinemia [see comments]. *Ann Oncol* 1998,9(5):495-8.
37. LUPPI, M, LONGO, G, FERRARI, MG, FERRARA, L, MARASCA, R, BAROZZI, P, MORSELLI, M, EMILIA, G, TORELLI, G. Additional neoplasms and HCV infection in low-grade lymphoma of MALT type. *Br J Haematol* 1996,94(2):373-5.
38. DE VITA, S, SANSONNO, D, DOLCETTI, R, FERRACCIOLI, G, CARBONE, A, CORNACCHIULO, V, SANTINI, G, CROVATTO, M, GLOGHINI, A, DAMMACCO, F, ET AL. Hepatitis C virus within a malignant lymphoma lesion in the course of type II mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1995,86(5):1887-92.
39. FERRI, C, LO JACONO, F, MONTI, M, CARACCILO, F, LA CIVITA, L, BARSANTI, LA, LONGOMBARDO, G, LOMBARDINI, F, CARECCIA, G, ZIGNEGO, AL. Lymphotropic virus infection of peripheral blood mononuclear cells in B- cell non-Hodgkin's lymphoma. *Acta Haematol* 1997,98(2):89-94.
40. ZIGNEGO, AL, GIANNINI, C, GENTILINI, P, BELLESI, G, HADZIYANNIS, S, FERRI, C. Could HGV infection be implicated in lymphomagenesis? [letter]. *Br J Haematol* 1997,98(3):778-9.
41. SUGAWARA, Y, MAKUUCHI, M, KATO, N, SHIMOTOHNO, K, TAKADA, K. Enhancement of hepatitis C virus replication by Epstein-Barr virus- encoded nuclear antigen 1. *Embo J* 1999,18(20):5755-60.
42. LENZI, M, FRISONI, M, MANTOVANI, V, RICCI, P, MURATORI, L, FRANCESCONI, R, CUCCIA, M, FERRI, S, BIANCHI, FB. Haplotype HLA-B8-DR3 confers susceptibility to hepatitis C virus- related mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1998,91(6):2062-6.
43. ZIGNEGO, AL, MACCHIA, D, MONTI, M, THIERS, V, MAZZETTI, M, FOSCHI, M, MAGGI, E, ROMAGNANI, S, GENTILINI, P, BRECHOT, C. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus [see comments]. *J Hepatol* 1992,15(3):382-6.
44. ZIGNEGO, AL, FERRI, C, MONTI, M, LACIVITA, L, GIANNINI, C, CARECCIA, G, GIANNELLI, F, PASERO, G, BOMBARDIERI, S, GENTILINI, P. Hepatitis C virus as a lymphotropic agent: evidence and pathogenetic implications. *Clin Exp Rheumatol* 1995,13 Suppl 13: S33-7.
45. ZIGNEGO, AL, DE CARLI, M, MONTI, M, CARECCIA, G, LA VILLA, G, GIANNINI, C, D'ELIOS, MM, DEL PRETE, G, GENTILINI, P. Hepatitis C virus infection of mononuclear cells from peripheral blood and liver infiltrates in chronically infected patients. *J Med Virol* 1995,47(1):58-64.
46. DE VITA, S, SACCO, C, SANSONNO, D, GLOGHINI, A, DAMMACCO, F, CROVATTO, M, SANTINI, G, DOLCETTI, R, BOIOCCHI, M, CARBONE, A, ZAGONEL, V. Characterization of overt B-cell lymphomas in patients with hepatitis C virus infection. *Blood* 1997,90(2):776-82.
47. MECCHIA, M, CASATO, M, TAFI, R, FILOCAMO, G, BONOMO, L, FIORILLI, M, CORTESE, R, MIGLIACCIO, G, NICOSIA, A. Nonrheumatoid IgM in human hepatitis C virus-associated type II cryoglobulinemia recognize mimotopes of the CD4-like LAG-3 protein. *J Immunol* 1996,157(8):3727-36.
48. BRONOWICKI, JP, LORIOT, MA, THIERS, V, GRIGNON, Y, ZIGNEGO, AL, BRECHOT, C. Hepatitis C virus persistence in human hematopoietic cells injected into SCID mice [see comments]. *Hepatology* 1998,28(1):211-8.

49. SANSONNO, D, DE VITA, S, CORNACCHIULO, V, CARBONE, A, BOIOCCHI, M, DAMMACCO, F. Detection and distribution of hepatitis C virus-related proteins in lymph nodes of patients with type II mixed cryoglobulinemia and neoplastic or non-neoplastic lymphoproliferation. *Blood* 1996,88(12):4638-45.
50. SANSONNO, D, DE VITA, S, IACOBELLI, AR, CORNACCHIULO, V, BOIOCCHI, M, DAMMACCO, F. Clonal analysis of intrahepatic B cells from HCV-infected patients with and without mixed cryoglobulinemia. *J Immunol* 1998,160(7):3594-601.
51. ZIGNEGO, AL, GIANNELLI, F, MARROCCHI, ME, GIANNINI, C, GENTILINI, P, INNOCENTI, F, FERRI, C. Frequency of bcl-2 rearrangement in patients with mixed cryoglobulinemia and HCV-positive liver diseases [letter]. *Clin Exp Rheumatol* 1997,15(6):711-2.
52. ZIGNEGO, AL, GIANNELLI, F, MARROCCHI, ME, MAZZOCCA, A, FERRI, C, GIANNINI, C, MONTI, M, CAINI, P, VILLA, GL, LAFFI, G, GENTILINI, P. T(14;18) translocation in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2000,31(2): 474-9.
53. KITAY-COHEN, Y, AMIEL, A, HILZENRAT, N, BUSKILA, D, ASHUR, Y, FEJGIN, M, GABER, E, SAFADI, R, TUR-KASPA, R, LISHNER, M. Bcl-2 rearrangement in patients with chronic hepatitis C associated with essential mixed cryoglobulinemia type II [In Process Citation]. *Blood* 2000,96(8):2910-2.
54. PILERI, P, UEMATSU, Y, CAMPAGNOLI, S, GALLI, G, FALUGI, F, PETRACCA, R, WEINER, AJ, HOUGHTON, M, ROSA, D, GRANDI, G, ABRIGNANI, S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 1998,282(5390):938-41.
55. CORY, S, VAUX, DL, STRASSER, A, HARRIS, AW, ADAMS, JM. Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res* 1999,59(7 Suppl):1685s-1692s.
56. RAY, RB, LAGGING, LM, MEYER, K, STEELE, R, RAY, R. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 1995,37(3):209-20.

**SCENARI PRESENTI E FUTURI DELLE INFEZIONI DA HCV IN ITALIA**

Evangelista Sagnelli, Nicola Caporaso

## **EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI ACUTE DA VIRUS EPATITICI A TRASMISSIONE PARENTERALE**

Alfonso Mele, Enea Spada

*Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Le infezioni determinate dai principali virus epatitici a trasmissione parenterale (HBV e HCV) rappresentano un rilevante problema di sanità pubblica in Italia, a causa delle migliaia di morti per cirrosi ed epatocarcinoma, attribuibili ad infezioni croniche da HBV e HCV, che si verificano ogni anno (1, 2). In aggiunta, sebbene l'incidenza di entrambi i tipi epatite si sia ridotta nel corso delle ultime decadi (3), si verificano ancora numerose nuove infezioni. La prevalenza di portatori cronici del virus è stata stimata intorno all'1% per l'infezione da HBV (4-6), e variabile dal 3.2 % (nel nord) al 12.6% (nel sud) per l'infezione da HCV, con i più alti valori di prevalenza tra la popolazione anziana (>30%) (7-9).

Qui si riportano le caratteristiche epidemiologiche fondamentali delle epatiti acute a trasmissione parenterale, desunte dai dati del sistema nazionale di sorveglianza delle epatiti acute virali (SEIEVA) (10) nel corso degli anni 1986-99

### **Incidenza**

L'incidenza delle epatiti virali acute a trasmissione parenterale ha mostrato un lento ma costante declino nel corso degli anni ed attualmente ad esse è ascrivibile meno della metà dei casi di epatite virale acuta notificati al SEIEVA. In particolare, dal 1986 al 1999 l'incidenza dell'epatite B è passata dal 12 al 3 per 100.000, mentre quella dell'epatite non-A, non-B (con positività per anti-HCV di oltre il 60% al momento dell'ospedalizzazione) ha subito una riduzione, nello stesso periodo da 4 a 1 per 100.000 (Tabella 1).

La riduzione dell'incidenza dell'epatite B è stata più evidente prima (da 12 a 5 per 100.000) che dopo (da 4 a 3 per 100.000) l'introduzione della vaccinazione obbligatoria anti-epatite B per i nuovi nati e gli adolescenti nel 1991, ed ha interessato tutte le aree geografiche. L'incidenza è più alta nel Nord-Centro Italia (Tabella 1) e nei maschi.

**Tabella 1** - Tassi di incidenza (x 100.000) dell'epatiti virali a trasmissione parenterale, per anno e per area geografica. SEIEVA 1986-1999

Tipo di epatite	Anni													
	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
Area di residenza														
<b>Epatite B</b>														
Nord-Centro	12	12	7	7	7	5	4	4	3	3	3	3	4	3
Sud-Isole	10	4	5	3	2	4	5	5	3	3	2	2	1	2
Totale Italia	12	10	7	6	5	5	4	4	3	3	3	3	3	3
<b>Epatite non-A, non-B</b>														
Nord-Centro	6	4	3	3	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1
Sud-Isole	6	3	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1
Totale Italia	4	3	3	3	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1

La fascia di età 15-24 anni è ancora quella per cui si registrano i valori di incidenza più elevati, anche se per questi soggetti il calo d'incidenza nel corso degli anni è stato particolarmente evidente (Tabella 2).

L'incidenza dell'epatite non-A, non-B ha subito una riduzione da 4 a 1 per 100.000 dal 1986 al 1999, mantenendosi poi costante. Tale riduzione ha interessato tutte le aree geografiche (Tabella 1) ed è stata particolarmente evidente per la fascia di età 15-24 anni (Tabella 2). L'incidenza dei casi notificati annualmente non mostra differenze degne di rilievo per quanto riguarda il sesso e la distribuzione geografica. Per quanto riguarda l'età, se fino a pochi anni fa si registrava un picco d'incidenza nella fascia 15-24 anni, nel corso degli ultimi anni i casi notificati sono stati altrettanto frequenti nei soggetti di età superiore ai 25 anni (Tabella 2).

**Tabella 2 -** Tassi di incidenza (per 100.000) delle epatiti a trasmissione parenterale per anno e per classi di età. SEIEVA 1986-1999

Tipo di epatite	Anni													
	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
<b>Epatite B</b>														
0 - 14	3	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	0,5	0,4	0,3
15 - 24	35	31	22	19	17	12	10	10	6	6	5	5	4	3
25 o più	9	8	5	5	4	4	3	4	4	3	3	4	3	3
Totale	12	10	7	6	5	5	4	4	3	3	3	3	3	3
<b>Epatite non-A, non-B</b>														
0 - 14	1	0,5	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,2
15 - 24	10	8	9	8	6	5	4	3	3	2	2	1	1	1
25 o più	4	3	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1
Totale	4	3	3	3	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1

### Caratteristiche cliniche

Il tasso di ospedalizzazione dei casi notificati durante il periodo 1986-99 è stato del 93% per l'epatite B, del 87% per l'epatite C e del 93% per i casi di epatite non-A, non-B anti HCV negativi al momento dell'esordio (epatiti non-A, non-C). L'ittero era presente nel 83% dei casi di epatite B, nel 62% dei casi di epatite C e nel 71% dei casi di epatite non-A, non-C. La durata media di degenza in ospedale è stata di 18 giorni per l'epatite B, 16 giorni per l'epatite C e 15 giorni per l'epatite non-A, non-C. Il tasso di letalità è stato di 0.5% per l'epatite B, 0.3% per l'epatite C e 0.0% per l'epatite non-A, non-C.

### Fattori di Rischio

*Epatite B* - I fattori di rischio riportati dai casi di epatite acuta B nei 6 mesi precedenti l'esordio della malattia sono mostrati in Tabella 3.

**Tabella 3 -** *Frequenza dei fattori di rischio non mutualmente esclusivi\* riportati dai casi di epatite B. SEIEVA 1986-1998*

<b>Fattori di rischio</b>	<b>1986 (%)</b>	<b>1987 (%)</b>	<b>1988 (%)</b>	<b>1989 (%)</b>	<b>1990 (%)</b>	<b>1991 (%)</b>	<b>1992 (%)</b>	<b>1993 (%)</b>	<b>1994 (%)</b>	<b>1995 (%)</b>	<b>1996 (%)</b>	<b>1997 (%)</b>	<b>1998 (%)</b>	<b>1999 (%)</b>
Interventi chirurgici	11	10	11	10	9	10	9	12	13	12	9	13	14	14
Altre esposizioni parenterali**	19	20	21	20	19	23	26	28	29	35	29	35	34	35
Uso di droghe	15	16	15	21	29	25	27	26	19	21	20	17	16	18
Contatto con itterico	0	5	9	12	10	7	7	6	8	6	6	6	5	4
Cure odontoiatriche	26	26	25	25	25	25	27	28	28	29	31	28	31	27
> 1 partner sessuale	35	30	29	29	31	33	33	40	41	33	41	36	37	30
Convivente HBsAg+	19	20	21	20	18	13	14	14	12	12	15	12	11	12
Personale sanitario	4	2	3	2	4	4	1	2	2	1	1	1	2	2
Trasfusioni	5	4	4	6	3	3	2	3	1	3	2	2	3	3

\* I casi possono riportare più di un fattore di rischio

\*\* Buchi all'orecchio, tatuaggi, agopuntura, elettrocoagulazione, manicure.

I rapporti sessuali con più di un partner rappresentano il fattore di rischio più frequentemente riportato, con una tendenza all'aumento nel corso degli anni considerati. Con alta frequenza sono pure riportati altri comuni tipi di esposizione parenterale (manicure, pedicure, rasatura dal barbiere, piercing, diatermo-coagulazione, tatuaggi, agopuntura), la terapia odontoiatrica e l'uso di droghe endovena. È degna di nota la percentuale significativa di soggetti che, nei 6 mesi precedenti l'esordio dell'epatite acuta B, riferisce interventi chirurgici e la convivenza con soggetti HBsAg positivi, soprattutto perché in questi casi sono realmente attuabili efficaci misure di prevenzione immunitaria e non immunitaria. Solo una piccola percentuale di soggetti riporta, invece, trasfusioni di sangue o l'impiego in servizi di assistenza sanitaria. È da notare la graduale riduzione nel tempo della percentuale di soggetti che riportano come fattore di rischio l'impiego in servizi di assistenza sanitaria, la convivenza con soggetti HBsAg positivi e, a partire dal 1990, l'uso di droghe endovena.

*Epatite non-A, non-B* - Anche per l'epatite acuta non-A, non-B i fattori di rischio più frequentemente riportati sono le altre esposizioni parenterali, l'uso di droghe endovena e la terapia odontoiatrica (Tabella 4). La percentuale dei casi che, nei 6 mesi precedenti, riferivano trasfusioni di sangue è passata da un massimo del 20% del 1986 ad un minimo 2% del 1993 mantenendosi poi costante negli anni successivi e risalendo al 6% nel 1998. Invece, è ancora elevata la percentuale di soggetti riportanti un

intervento chirurgico e rapporti sessuali con più di un partner. E' da notare l'aumento nel tempo della percentuale dei casi che riferiva altre esposizioni parenterali e l'uso di droghe endovena.

**Tabella 4** - *Frequenza dei fattori di rischio non mutualmente esclusivi\* riportati dai casi di epatite nonA-nonB. SEIEVA 1986-1998*

Fattori di rischio	1986 (%)	1987 (%)	1988 (%)	1989 (%)	1990 (%)	1991 (%)	1992 (%)	1993 (%)	1994 (%)	1995 (%)	1996 (%)	1997 (%)	1998 (%)	1999 (%)
Trasfusioni	20	14	15	14	10	6	3	2	3	2	2	3	6	2
Interventi chirurgici	24	16	19	19	16	14	13	15	16	16	13	17	20	18
Altre esposizioni parenterali**	15	17	14	19	17	21	22	23	27	28	25	25	33	33
Cure odontoiatriche	20	19	19	21	20	25	24	26	30	22	28	23	27	21
Uso di droghe	14	18	20	19	23	26	25	27	25	21	20	25	28	28
> 1 partner sessuale	31	25	21	29	18	20	33	30	35	31	30	19	21	22
Personale sanitario	2	2	3	3	2	3	2	3	3	3	3	3	4	2

\* I casi possono riportare più di un fattore di rischio

\*\* Buchi all'orecchio, tatuaggi, agopuntura, elettrocoagulazione, manicure.

## Conclusioni

Le epatiti a trasmissione parenterale hanno subito nel corso degli anni un'importante riduzione di incidenza da ascrivere congiuntamente a fattori di ordine socioeconomico e sanitario: miglioramento delle condizioni socioeconomiche, nuclei familiari di dimensioni più ridotte, introduzione dello screening per anti-HCV delle donazioni di sangue, test di screening per HBV ed HCV sempre più sensibili, diffusione dell'impiego di siringhe monouso, e l'impatto della campagna di informazione contro l'AIDS. La vaccinazione obbligatoria anti-epatite B ha contribuito in parte e ulteriormente contribuirà a questa riduzione d'incidenza. Infatti, è probabile che gli effetti della vaccinazione anti-epatite B saranno più evidenti nei prossimi anni allorché i bambini vaccinati entreranno nell'età di maggiore rischio. Va sottolineato l'alto rischio a cui sono ancora esposti i conviventi di soggetti HBsAg positivi, nonostante che per questi soggetti la vaccinazione sia fortemente raccomandata ed offerta gratuitamente.

La riduzione dell'incidenza delle epatiti a trasmissione parenterale registrata dal SEIEVA è in accordo con i risultati di studi sieroepidemiologici, che hanno documentato in Italia una riduzione della diffusione dell'infezione da HBV e HCV specialmente tra gli adolescenti ed i giovani adulti (11-16).

Attualmente, a parte l'uso di droghe per via endovenosa e le trasfusioni di sangue (a cui sono ancora attribuibili alcuni casi di epatite, nonostante la migliore sensibilità dei

tests di screening), i più importanti e prevenibili fattori di rischio nella popolazione generale sono i rapporti sessuali con persone infette, i trattamenti medico-chirurgici ed estetici. Programmi di prevenzione non immunologica fondati sull'informazione del rischio di trasmissione sessuale e su metodi efficaci di sterilizzazione e mantenimento degli strumenti, usati durante i trattamenti medico-chirurgici ed estetici, sono pertanto di fondamentale importanza.

### Bibliografia

- 1) DE BAC, C, STROFFOLINI, T, GAETA, GB, TALIANI, G, GIUSTI, G. Pathogenic factors in cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma: a multicenter Italian study. *Hepatology* 1994,20: 1442-9.
- 2) STROFFOLINI, T, ANDREONE, P, ANDRIULLI, A, ASCIONE, A, CRAXÌ, A, CHIARAMONTE, M. ET AL. Characteristic of hepatocellular carcinoma in Italy. *J Hepatol* 1998,29: 944-52.
- 3) MELE, A, STROFFOLINI, T, PASQUINI, P. Integrated epidemiological system for acute viral hepatitis. Report 1985-1994. *Istisan* 1996,3: 1-33.
- 4) STROFFOLINI, T, CHIARAMONTE, M, CRAXÌ, A, FRANCO, E, RAPICETTA, M, TRIVELLO, R. ET AL. Baseline sero-epidemiology of hepatitis B virus infection in children and teenagers in Italy. A survey before mass hepatitis B vaccination. *J Infect* 1991,22:191-9.
- 5) D'AMELIO, R, MATRICARDI, PM, BISELLI, R, STROFFOLINI, T, MELE, A, SPADA, E ET AL. Changing epidemiology of hepatitis B in Italy: public health implications. *Am J Epidemiol* 1992,135: 1012-8.
- 6) STROFFOLINI, T, GUADAGNINO, V, CHIONNE, P, PROCOPIO, B, MAZZUCA, EG, QUINTIERI, F ET AL. A population based survey of hepatitis B virus infection in a Southern Italian town. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997,29: 415-9.
- 7) BELLENTANI, S, TIRIBELLI, C, SACCOCCIO, G, SODDE, M, FRATTI, N, DE MARTIN, C ET AL. Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos study. *Hepatology* 1994,20: 1442-9.
- 8) STROFFOLINI, T, MENICHELLI, M, TALIANI, G, DAMBRUOSO, V, POLIANDRI, G, BOZZA, A ET AL. High prevalence of hepatitis C virus infection in a small central Italian town. *Ital J Gastroenterol* 1995,27: 235-8.
- 9) GUADAGNINO, V, STROFFOLINI, T, RAPICETTA, M, COSTANTINO, A, KONDILI, LA, MENNITI IPPOLITO, F ET AL. Prevalence, risk factors and genotype distribution of hepatitis C virus infection in the general population: a community-based survey in southern Italy. *Hepatology* 1997,26: 1006-11.
- 10) MELE, A, STAZI, MA, GILL, ON, PASQUINI, P, AND SEIEVA COLLABORATING GROUP. Prevention of hepatitis B in Italy: lesson from surveillance of type-specific viral hepatitis. *Epidemiol Infect* 1990,104: 135-41.
- 11) STROFFOLINI, T, CHIARAMONTE, M, CRAXÌ, A, FRANCO, E, RAPICETTA, M, TRIVELLO, R ET AL. Baseline sero-epidemiology of hepatitis B virus infection in children and teenagers in Italy. A survey before mass hepatitis B vaccination. *J Infect* 1991,22:191-9.
- 12) D'AMELIO, R, MATRICARDI, PM, BISELLI, R, STROFFOLINI, T, MELE, A, SPADA, E ET AL. Changing epidemiology of hepatitis B in Italy: public health implications. *Am J Epidemiol* 1992,135:1012-8.
- 13) STROFFOLINI, T, GUADAGNINO, V, CHIONNE, P, PROCOPIO, B, MAZZUCA, EG, QUINTIERI, F ET AL. A population based survey of hepatitis B virus infection in a Southern Italian town. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997,29:415-9.
- 14) ROMANÒ, L, AZARA, CHIARAMONTE, M ET AL. Low prevalence of anti-HCV antibody among Italian children. *Infection* 1994,22:1225-30.

- 15) D'AMELIO, R, STROFFOLINI, T, MATRICARDI, PM ET AL. Low prevalence of anti-HCV antibody among Italian air forces recruits. *Scand J Infect Dis* 1995,27:12-4.
- 16) GUADAGNINO, V, STROFFOLINI, T, RAPICETTA, M, COSTANTINO, A, KONDILI, LA, MENNITI IPPOLITO, F ET AL. Prevalence, risk factors and genotype distribution of hepatitis C virus infection in the general population: a community-based survey in southern Italy. *Hepatology* 1997,26:1006-11.

## LE EPATOPATIE CRONICHE DA HCV

Giovanni B. Gaeta, Gianfranca Stornaiuolo  
*Istituto di Malattie Infettive, Seconda Università di Napoli*

La diffusione dei virus epatitici a trasmissione parenterale ha toccato in Italia la massima intensità tra gli anni 60 e la metà degli anni 80. Da tale periodo è iniziato un declino della incidenza di infezioni legato principalmente alle migliori conoscenze delle vie di trasmissione, alla diffusa adozione di materiali medici disposable e, più in generale all'elevarsi del livello igienico sanitario. L'adozione di molte misure preventive è stata indubbiamente accelerata dalla epidemia di HIV. Per finire, l'introduzione della vaccinazione obbligatoria anti-HBV per i neonati e i dodicenni a partire dal 1991 ha sostanzialmente contribuito ad elevare una solida barriera difensiva contro l'epatite B e Delta (1). L'infezione cronica da HCV ha una durata di molte decadi, causa una malattia epatica a decorso il più delle volte indolente. Di conseguenza, il pool dei soggetti cronicamente infetti dal virus si è andato enormemente espandendo. Quello che osserviamo oggi è in buona parte il risultato a distanza del passato livello di endemia e solo in proporzione minore il risultato del persistere di alcune aree di rischio di contagio per i virus epatitici e per HCV in particolare.

### Le fonti di informazione

La Tabella 1 riassume le fonti di informazione disponibili in tema di epidemiologia delle epatiti croniche.

**Tabella 1 -** *Epidemiologia delle epatiti croniche virali: fonti di informazione*

- Studi su pazienti riferiti a centri clinici
- Studi su gruppi particolari (donatori, comunità, etc.)
- Dati di mortalità
- Studi su popolazione aperta

Sono numerosi gli studi su pazienti riferiti a centri specialistici, essi tuttavia rappresentano un sottogruppo dei casi di infezione cronica, usualmente con manifestazioni o quadri clinici più gravi (*referral bias*). Peraltro, la tipologia dei pazienti può variare nei differenti centri in relazione al bacino di utenza (per es., centri collegati con banche di sangue). Gli studi su gruppi particolari riguardano soggetti super-selezionati. Ad esempio, i donatori di sangue sono per definizione soggetti in buona salute, di solito di età giovanile; coloro che vivono in comunità chiuse o afferiscono a

taluni ambienti di lavoro possono essere esposti a fattori di rischio particolari, etc. Questo tipo di studi è utile per individuare gruppi a rischio.

L'utilizzo dei dati di mortalità specifica fornisce informazioni sul sottogruppo di soggetti con malattia cronica avanzata. Il loro utilizzo presuppone una notifica accurata delle cause di morte. Da essi, si può ricavare l'andamento nel tempo di un tasso di mortalità, anche se l'interpretazione di eventuali variazioni è influenzata da una serie di fattori, come ad esempio una modifica nel tempo delle tecniche di diagnosi o un aumento di sopravvivenza dei casi prevalenti.

Gli studi di popolazione sono in grado di fornire dati di prevalenza e, se disegnati allo scopo, di incidenza. Essi comportano la prerogativa di evidenziare l'intero spettro clinico conseguente alle infezioni croniche da virus epatitici o, in altre parole, consentono di disegnare l'epidemiologia delle infezioni e quella della malattia.

### **Quale ricaduta per l'epidemiologo? Quale per il clinico?**

La classica ricaduta degli studi epidemiologici è sulla migliore conoscenza della prevalenza ed incidenza di malattia e delle vie di trasmissione in una data area geografica in un periodo di tempo definito, dati dai quali è possibile valutare l'opportunità e il tipo di misure di prevenzione. La programmazione della politica sanitaria e la seguente allocazione delle risorse economiche è o dovrebbe essere strettamente influenzata da tali dati.

Negli ultimi anni la ricerca in epidemiologia si è andata arricchendo di stretti legami con la clinica e la biologia molecolare. Il rapido modificarsi di talune situazioni epidemiologiche ha reso evidente la stretta relazione con la storia clinica delle epatopatie croniche quale oggi si osserva. Ad esempio è ben evidente come l'epatite cronica B abbia modificato negli anni più recenti i suoi quadri clinici in relazione alla ridotta incidenza di infezioni infantili ed alla emergenza di forme da mutanti e-minus. Parimenti, l'epatite cronica C vede un progressivo espandersi del pool dei pazienti con genotipo non-1 di HCV, con importanti ricadute sul piano terapeutico, e probabilmente è in atto anche una progressiva modifica dello spettro clinico della malattia (2,3).

Studi di incidenza delle epatite cronica C su campioni di popolazione aperta sono resi difficili dal fatto che l'esordio della epatite cronica è solitamente asintomatico. Tuttavia, se si tiene conto che il tasso di cronicizzazione di una infezione acuta da HCV è intorno all'80% e che l'incidenza di epatite acuta C in Italia è diminuita di almeno 5 volte nell'arco degli ultimi 15 anni, (da 5 a meno di 1 caso/100.000; dati SEIEVA) si può desumere che anche l'incidenza di infezioni croniche è in forte decremento. Al declino delle infezioni da HCV si è giunti attraverso un progressivo controllo delle tradizionali vie di infezione, in particolare la via trasfusionale e, più tardi, una progressiva riduzione del contagio per via iatrogena e per altre modalità legate a basso livello igienico-sanitario.

### **Fattori di rischio**

Una sintesi dei principali fattori di rischio di contagio per l'epatite C è riportata nella Tabella 2.

**Tabella 2 - Fattori di rischio di infezione da HCV**

<b>Misura del rischio</b>			
	<b>Forza</b>	<b>Frequenza</b>	<b>Età</b>
Droga e.v.	Elevata	Medio bassa	16 – 30
Trasfusione	Bassa (elevata in passato)	Bassa	Tutte (adulta)
Esposizione parenterale itrogena	Bassa (elevata in passato)	Elevata	Tutte
Ambiente familiare		Controversa	Adulta – anziana
Madre portatrice	0 – 6%	Bassa	Neonatale
Contatto sessuale	Bassa	Elevata	Giovane adulta
Parenterale (non iatrogeno: piercing, tatuaggio)	Media	Bassa (?)	Giovane adulta

Ancora nella prima metà degli anni '90 l'esposizione iatrogena costituiva un fattore di rischio rilevante (4). E' verosimile che questa modalità di trasmissione sia stata per decenni una efficiente via di diffusione di HCV. Alcuni studi che hanno esplorato i rischi remoti di contagio in pazienti con epatite cronica C evidenziano una forte associazione con interventi chirurgici e/o l'uso di siringhe di vetro (5,6). L'estrema frequenza di queste esposizioni nella popolazione rende ragionevole attribuire ad esse un'elevata percentuale di casi di infezioni croniche (*elevato rischio attribuibile*). Per contro, fattori che risultano fortemente associati alla trasmissione di epatite C (per es. l'uso di droghe per via endovenosa) possono essere responsabili di una ridotta quota di casi in quanto il numero degli esposti nella popolazione non è elevato. Una caratteristica delle misure relative ai fattori di rischio è il loro mutare nel tempo, pur nella stessa area geografica, in relazione all'evolversi del quadro igienico-sanitario, sociale, economico, etc. Ciò rende necessario un monitoraggio ripetuto.

### **Infezione o malattia?**

Gli studi di storia naturale sulle epatiti NANB inizialmente e poi sulle prime casistiche di epatite cronica C erano condotti in larga maggioranza su pazienti politrasfusi in seguito ad interventi chirurgici ed utilizzavano quale unico marcatore di infezione/malattia i valori di ALT. Ne deriva una selezione di pazienti con espressione clinica di malattia più grave ed evolutiva.

Solo gli studi su popolazione hanno mostrato lo spettro epidemiologico e clinico della infezione cronica da HCV. Da essi si evince che in Italia la prevalenza di soggetti anti-HCV positivi è intorno al 3% negli adulti al di sotto dei 50 anni, ma aumenta al 12-

40% nei soggetti di età superiore, con un gradiente Nord-Sud. Questo quadro è suggestivo di un effetto di coorte, il quale testimonia di un elevato livello di endemia nelle 2-4 decadi precedenti (7-11).

La maggioranza dei soggetti con anti-HCV presenta viremia, tuttavia segni di malattia epatica sono presenti in circa il 50% dei casi. In particolare, lo studio di Bellentani e coll. (7) che ha utilizzato nella diagnostica dei pazienti anti-HCV positivi la determinazione di ALT e l'ultrasonografia, mostra che epatite cronica era presente nel 35% di essi e cirrosi nell'11%. Nell'insieme, quindi, un quadro di malattia era presente in meno della metà dei soggetti con anti-HCV. Studi di popolazione che hanno utilizzato solo l'ALT come indicatore di malattia (10) giungono a conclusioni molto vicine, suggerendo inoltre che l'utilizzo della sola determinazione di ALT non è utile per l'identificazione di soggetti HCV positivi.

### **L'osservatorio clinico**

In Italia, come in altri paesi, l'infezione cronica da HCV è responsabile della maggioranza delle epatiti croniche (50-80%), con differenze legate alla specificità dei reparti clinici ed al loro bacino di utenza (12). Nei pazienti con cirrosi l'infezione da HCV condivide con l'alcool la maggiore responsabilità etiopatogenetica. Certamente l'alcool è un fattore di aggravamento della malattia anche in una proporzione di pazienti con cirrosi ad etiologia virale (13-15)

### **Quanti sono i pazienti con epatopatie croniche da HCV?**

Un primo tentativo di stima quantitativa dei casi di cirrosi in Italia è stato effettuato a partire dai dati di mortalità per epatopatie croniche (16). Per una mortalità di 28/100.000, i casi globali di cirrosi in Italia erano stimati in circa 120.000.

Gli studi di popolazione più sopra citati permettono una stima più articolata. Oltre 500.000 sarebbero i pazienti di età fino a 60 anni affetti da epatopatia da HCV, che si aggiungono a quelli affetti da altre eziologie. Questa stima, peraltro, non tiene conto dell'ampio pool dei pazienti portatori di infezione da HCV nelle età più avanzate.

### **Cofattori**

Abbiamo già accennato al consumo alcolico quale fattore di frequente associato alla infezione cronica C, (oltre che causa primitiva di danno epatico), in particolare nei pazienti con cirrosi scompensata (15). La coinfezione con il virus dell'epatite B è un fattore prognostico negativo (13). In una serie di oltre 800 pazienti con epatite cronica B, circa il 7% presentava anti-HCV (dato personale). Di recente è stato proposto il possibile ruolo di una infezione "occulta" da HBV nella progressione e nella resistenza

alla terapia della epatite cronica C (17,18). Circa un terzo dei pazienti con epatite C potrebbe presentare tale condizione, almeno in talune aree geografiche.

Per finire, resta da definire la possibile interazione con cause metaboliche (diabete, obesità) o sconosciute di danno epatico (19). Un recente studio di popolazione (10) orientato allo studio della prevalenza di infezioni da HCV, mostra come circa il 30% di pazienti con anti-HCV ma HCV-RNA negativi presenti ipertransaminasemia.

### Bibliografia

1. AISF, Commissione Epidemiologica: Epidemiologia delle epatopatie acute e croniche in Italia.
2. NOUSBAUM JB., POL S., NALPAS B. ET AL. Hepatitis C virus type 1b in France and Italy. *Ann Intern Med* 1995;122:161-168.
3. SARACCO G., SOSTEGNI R., GHISSETTI V. ET AL. Hepatitis C virus genotypes in a non-cirrhotic Italian population with chronic hepatitis C: correlation with clinical, virological and histological parameters. Results of a prospective multicentre study. *J Viral Hepatitis* 2000;7:124-129.
4. MELE A., TOSTI ME., MARZOLINI A. ET AL. Prevention of hepatitis C in Italy lessons from surveillance of type-specific acute viral hepatitis. *J Viral Hepatitis* 2000;7:30-35.
5. CHIARAMONTE M., STROFFOLINI T., LORENZONI V. ET AL. Risk factors in community acquired hepatitis C virus chronic infection: a case control study in Italy. *J Hepatol* 1996;24:129-134.
6. GAETA GB., STROFFOLINI T., TALIANI G. ET AL. Surgical procedures as a major risk factor of chronic hepatitis C virus infection in Italy: evidence from a case-control study. *Int J Infect Dis* 1999;4:207-210.
7. BELLENTANI S., TIRIBELLI C., SACCOCCIO G. ET AL. Prevalence of chronic liver disease in the general population of Northern Italy: The Dionysos study. *Hepatology* 1994;20:1442-1449.
8. STROFFOLINI T., MENCHINELLI M., TALIANI G. ET AL. High prevalence of hepatitis C virus infection in a small central Italian town: lack of evidence of parenteral exposure. *Italian J Gastroenterol* 1995;27:235-238
9. GUADAGNINOV., STROFFOLINI T., RAPICETTA M. ET AL. Prevalence, risk factors and genotype distribution of hepatitis C virus infection in the general population: a community based survey in Southern Italy. *Hepatology* 1997;26:1006-1011.
10. MAIO G., D'ARGENIO P., STROFFOLINI T. ET AL. Hepatitis C virus infection and alanine transaminase levels in the general population: a survey in a southern Italy town. *J Hepatol* 2000;33:116-120.
11. COPPOLA RC., MASIA G., PRADAT P. ET AL. Impact of hepatitis C virus infection on healthy subjects on an Italian island. *J Viral Hepatitis* 2000;7:130-137.
12. GIUSTI G., SAGNELLI E., GALLO C. ET AL. The etiology of chronic hepatitis in Italy: a multicentre study. *Hepatogastroenterology* 1994;41:397-400.
13. RONDOT-THORAVAL F., BASTIE A., PAWLOTSKY JM. ET AL. Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: a French survey of 6664 patients. *Hepatology* 1997;26:485-490.
14. DE BAC C., STROFFOLINI T., GAETA GB. ET AL. Pathogenic factors in cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma: a multicentre Italian Study. *Hepatology* 1994;20:1225-1230.
15. CORRAO G., ZAMBON A., TORCHIO P. ET AL. Attributable risk for symptomatic liver cirrhosis in Italy. *Hepatology* 1998;28:608-614.
16. ISTAT. Cause di morte. [www.istat.it](http://www.istat.it)

17. CACCIOLA I., POLLICINO T., SQUADRITO G. ET AL. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C. *New Engl J Med* 1999,341:22-26.
18. SAGNELLI E., COPPOLA N., SCOLASTICO C. ET AL. Virological and clinical expressions of reciprocal inhibitory effect of hepatitis B, C and Delta viruses in patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 2000,32:1106-1110.
19. BELLENTANI S., SACCOCCIO G., MASUTTI F. ET AL. Prevalence and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 2000,132:112-117.

## INFLUENZA DI COFATTORI NELLA STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE DA HCV

M. Chiaramonte

*Cattedra ed Unità Operativa di Gastroenterologia, Dipartimento di Medicina Interna e Sanità Pubblica, Università e ASL 04, L'Aquila*

L'infezione cronica da HCV ha una diffusione piuttosto elevata in Italia, con variazioni dal 3-4% nel Nord fino al 12% nel Sud nella popolazione generale. E' particolarmente elevata in popolazione anziana, in tutta Italia (Bellentani et al., 1994; Lobello et al., 1996; Guadagnino et al., 1997).

E' ormai ben noto che l'infezione da HCV può assumere un decorso molto variabile, da infezione completamente asintomatica, a forme di epatopatia rapidamente evolutiva, fino all'epatocarcinoma. In alcuni casi inoltre l'infezione può dare origine a malattie ematologiche come crioglobulinemia, linfoma non-Hodgkin e paraproteinemie. E' stata inoltre associata a numerose manifestazioni extraepatiche (Tabella 1)

**Tabella 1- Manifestazioni extra epatiche in corso di infezione da HCV**

Associazione frequente	Associazione sporadica
1. Crioglobulinemia mista	1. Linfomi non-Hodgkin
2. Sindrome di Sjogren	2. Polimiosite
3. Interstiziopatia polmonare	3. Artrite Reumatoide
4. Tiroiditi autoimmuni	4. Anemia aplastica
5. Panarterite nodosa	5. Trombocitopenia idiopatica
6. Lichen planus	6. Diabete mellito
7. Glomerulonefrite	7. Ulcere corneali
8. Vasculite leucocitoclastica	8. Uveite
9. Porfiria Cutanea tarda	9. Eritema multiforme
	10. Eritema nodoso
	11. Orticaria
	12. Sindrome CREST
	13. Miositi
	14. Prurito idiopatico

Ovviamente risulta di grande interesse poter identificare le ragioni di una possibile evoluzione così diversa dell'infezione.

Sono stati presi in considerazione:

- fattori legati al virus (genotipo virale, carica virale,)
- fattori tipici dell'ospite (sesso, età all'infezione, genetica)
- fattori ambientali e/o esogeni (dieta, esotossici, altri virus)

### **Fattori virali**

*Genotipi virali* - Gli studi virologici ci hanno insegnato che l'HCV è un virus ipervariabile tanto da farlo considerare una quasispecie (Weiner et al., 1991). A tutt'oggi sono comunemente determinabili almeno 6 genotipi e 30 sottotipi di HCV-RNA (Simmonds et al., 1994).

I vari genotipi presentano una diversa distribuzione geografica (Dusheiko et al., 1994, McOmish et al., 1994). In Italia generalmente prevale il genotipo 1b. Vanno inoltre crescendo le dimostrazioni che i vari genotipi virali si siano diffusi in epoche storiche diverse in particolare il genotipo 1b sarebbe quello a diffusione più "antica" (Nosbaum et al., 1995).

Sulla base dei primi studi relativi ai genotipi era emersa una associazione fra genotipo 1b e malattia epatica "più severa" (Pozzato et al., 1994), maggiore rischio di cirrosi (Kobayashi et al., 1996) e maggiore rischio di evoluzione ad epatocarcinoma (Bruno et al., 1997). Tuttavia, da studi più recenti, che tengono conto anche dell'età di infezione, questa stretta associazione tra genotipo 1b e malattia più grave tende a ridimensionarsi (Benvegnù et al., 1997).

E' inoltre osservazione abbastanza comune che i pazienti con genotipo 1b rispondono meno bene alla terapia con Interferon (Yoshioka et al., 1992, Hino et al., 1994, Chemello 1994). Questo, secondo studi giapponesi, avrebbe una base biologica, in quanto la risposta all'alfa Interferon sarebbe modulata da una proteina non strutturale (NS5A) denominata per questo ISDR (Interferon Sensitivity Determining Region) (Enomoto et al., 1995). I pazienti con genotipo 1b presenterebbero delle mutazioni nella sequenza NS5A 2209-2248 che porterebbero ad una resistenza alla terapia con Interferon (Enomoto et al., 1995), attraverso la modificazione della produzione delle citochine.

Questo, descritto ampiamente in pazienti giapponesi (Kanai et al., 1995), non è stato però confermato in pazienti europei (Diodati et al., 1994).

Allo stato attuale delle conoscenze, pertanto, il significato dei genotipi virali nella storia naturale della malattia si sta ridimensionando. Il genotipo 1b, in fatti si associa epidemiologicamente, ad infezione più antica, si trova pertanto in pazienti più anziani e con infezione di più lunga durata: tutti elementi questi che sono associati a malattia più grave o più avanzata. Inoltre non è stato ancora identificato l'eventuale meccanismo patogenetico che giustificerebbe questa maggiore patogenicità del genotipo 1b. Rimane attualmente valido il ruolo predittivo di minore risposta all'Interferon del genotipo 1b.

### **Carica virale**

Di recente si sono introdotti test di dosaggio quantitativo di HCV circolante (Gretch et al., 1995).

E' dato abbastanza uniforme che la risposta alla terapia con Interferon sembra migliore in soggetti con viremia più bassa (Yuki et al., 1995; Yamada et al., 1995; Martinot-Peignoux et al., 1995; Magrin et al., 1996).

Una diretta correlazione, tuttavia, fra livelli di viremia e severità di malattia non è provata (Gretch et al., 1994; Noursbaum et al., 1995).

In sostanza i fattori legati al virus non sembrano influenzare in maniera rilevante la storia naturale dell'infezione.

### **Fattori dell'ospite**

*Sesso* - Analizzando tutti gli studi epidemiologici disponibili con attenzione alla distribuzione per sesso emerge che, a parità di infezione i maschi sviluppano una malattia epatica più severa delle femmine.

Infatti:

- negli studi epidemiologici in popolazione aperta risulta che nell'età avanzata il numero di portatori asintomatici di HCV aumenta e che questi soggetti sono prevalentemente di sesso femminile (Lobello et al., 1996; Guadagnino et al., 1997)
- suddividendo per sesso gruppi di portatori di HCV divisi in ragione della gravità della loro patologia emerge che fra i portatori asintomatici di HCV prevalgono le femmine mentre tra gli ammalati di patologia epatica prevalgono i maschi (Tabella 2)

**Tabella 2** - Distribuzione per sesso e espressione di malattia in portatori cronici di HCV

	<b>Femmine</b>	<b>Maschi</b>
Asintomatici (n° 135)	100 (74%)	35 (26%)
Epatite cronica/cirrosi (n° 117)	39 (33%)	78 (67%)

- tra i pazienti con epatocarcinoma associato a cirrosi epatica HCV correlata il rapporto maschi/femmine è (2.8:1) (Stroffolini et al., 1998)
- nel grande studio francese sulla storia naturale della epatopatia HCV correlata il sesso maschile rappresenta uno dei fattori di rischio di malattia più grave (Poynard et al., 1997)
- comparando gli studi di storia naturale della infezione da HCV postrasfusionale disponibili si osserva che nello studio di Tremolada et al. (1992) su cardioperati l'evoluzione ad epatite cronica e/o cirrosi è stata del 100%: essi erano per il 73% maschi.. Per contro esiste un'altro studio di sorveglianza su una larga coorte di pazienti con epatite posttrasfusionale che interessa 350 donne contagiate al momento del parto da una partita di immunoglobuline anti fattore Rh infette

(Wiese et al., 1995). Anche in questo caso la cronicizzazione dell'infezione si è osservata in un numero relativamente elevato di pazienti (68%), ma a distanza di 17 anni nessuna paziente ha sviluppato cirrosi, il 50% era portatrice asintomatica e il resto aveva epatite cronica.

La spiegazione di questa osservazione epidemiologica apre molte possibili ipotesi.

Una potrebbe essere che le femmine sono meno esposte a fattori di rischio ambientale come ad esempio l'uso di alcol oppure il rischio di infezioni associate che aggravano la storia naturale della malattia da HCV.

Un'altra ipotesi potrebbe implicare una diversa risposta immune indotta dal sistema ormonale femminile. Di fatto, ad esempio, le donne gravide infettate da HCV presentano una più alta viremia ma transaminasi nella norma (Gervais et al., 2000).

Un'ulteriore ipotesi da valutare potrebbe essere un ruolo dannoso di accumuli di ferro, dai quali la donna giovane è protetta dalle periodiche perdite mestruali.

### **Età all'infezione**

Sembra che l'infezione contratta in età matura (oltre i 50 anni) esponga ad una malattia più severa e più evolutiva (Poynard et al., 1997; Tremolada et al., 1992). Questo dato, tuttavia, è di difficile verifica in studi prospettici poiché attualmente sono diventate molto rare le nuove infezioni al di fuori di gruppi a rischio come i giovani tossicodipendenti.

### **Predisposizione genetica**

Come in tutte le malattie virali è stato ipotizzato che dei fattori genetici possano regolare la risposta immune influenzando pertanto e il tasso di cronicizzazione e/o l'espressione di malattia.

Gli studi finora disponibili in questo settore sono ancora pochi. I risultati inoltre sono parziali e senza definitive conclusioni. Questo è in parte dovuto alla diversa provenienza etnica delle popolazioni studiate ed in parte al fatto che in questa infezione è molto difficile identificare i soggetti che eliminano rapidamente l'infezione così da poterli comparare con i soggetti che sono rimasti portatori cronici di HCV (Thio et al., 2000)

L'argomento, però, è degno di attenzione e richiede studi attenti.

### **Fattori ambientali e/o esogeni**

*Alcol* - L'uso di alcol è l'unico fattore dietetico che risulta a tutt'oggi significativamente associato a modificazioni della storia naturale dell'infezione da HCV. Risulta importante la quantità media di alcol consumata durante tutta la vita. Sebbene

nella maggior parte dei casi si tenda ad identificare una dose critica che possa essere considerata sicura, al di sopra della quale soltanto ci sia danno epatico, da un recente grosso lavoro italiano (Aricò et al., 1997) emerge il convincimento che almeno nei soggetti anti-HCV + il rischio di sviluppare cirrosi cresce esponenzialmente con la quantità di alcol assunta giornalmente durante tutta la vita. La quantità di alcol regolarmente assunta sembra differenziare i soggetti asintomatici da quelli con malattia cronica di fegato (Chiaromonte et al., 1998), i soggetti con fibrosi avanzata da quelli senza fibrosi anche fra gli asintomatici (Mathurin et al., 1998), i soggetti con più rapida evoluzione a cirrosi (Poynard et al., 1997), e soggetti con più elevata evoluzione ad epatocarcinoma (Di Bisceglie, 1997). L'alcol riduce anche la risposta all'Interferon in pazienti HCV-RNA positivi (Okazaki et al., 1994). I meccanismi per cui l'alcol può interagire con l'HCV nell'aggravare la storia naturale di un'epatite da HCV non sono completamente noti. Vi sono alcune evidenze che l'alcol possa aumentare la replica virale (Oshita et al., 1994).

L'interazione fra alcol e HCV potrebbe modificare le risposte immunologiche dell'organismo alle cellule infettate (Takase et al., 1993). L'abuso alcolico aumenta la concentrazione di ferro ed è sempre più evidente che il ferro assume un ruolo di primaria epatotossicità nell'evoluzione della malattia epatica da HCV (Izumi et al., 1996).

## **Coinfezioni**

I pazienti con coinfezione HBV e HCV sono un gruppo non molto ampio (Fattovich et al., 1991; Gaeta et al., 1990). Tali pazienti presentano una malattia importante, anche se poco frequente, e gravata da una prognosi più severa e minore risposta alla terapia con Interferone (Weltmann et al., 1995). Inoltre viene riportata in letteratura una diagnosi istologica più severa ed una più frequente evoluzione ad epatocarcinoma (HCC) (Benvegnù et al., 1994, Chiaromonte et al., 1999). Gli studi effettuati pertanto sono concordi nell'affermare che esiste un effetto sinergico dei due virus nell'evoluzione clinica della malattia epatica. Tuttavia studi sierologici effettuati su pazienti con infezione mista da HBV e HCV dimostrano che i due virus non replicano mai contemporaneamente, ma sempre si verifica la "dominanza" di uno dei due con effetto inibitorio sulla replicazione dell'altro (Koike et al., 1995). Una più alta percentuale di pazienti presenta HCV-RNA positivo con inibizione della replica di HBV (Koike et al., 1995; Crespo et al., 1994). In questo gruppo di pazienti a prevalenza di infezione da HCV si riscontrano segni istologici di malattia più avanzata rispetto a quelli con HCV-RNA negativo (Crespo et al., 1994). Nei pazienti con attività prevalente HBV correlata è interessante notare come in maggioranza si tratti di soggetti HBeAg positivi, mentre i pazienti con HCV-RNA positivo sono quasi sempre anti-HBe positivi (Fiore et al., 1991; Pontisso et al., 1993). Esiste poi un gruppo di pazienti anti-HCV positivi con segni di pregresso contatto con HBV, ma senza anticorpi protettivi (quindi con presenza di anti-HBc isolato). Questa situazione indica una infezione remota, ma anche non completamente risolta come conferma la presenza di replica virale di HBV testata con

ibridizzazione e con metodica PCR (Villa et al., 1995; Gonzales et al., 1995) Questi pazienti presentano in genere una malattia molto più evolutiva e, sembrerebbe, maggiore rischio di epatocarcinoma.

### **Antiossidanti**

Lo stress ossidativo è stato implicato in vari tipi di danno epatocitario. In alcuni casi inoltre è stata dimostrata negli epatopazienti carenza di sostanze antiossidanti (es. carotenoidi) (Kaplowitz, 2000).

Nell'ipotesi che la presenza di radicali liberi e/o la carenza di antiossidanti nella dieta potesse giocare un ruolo nelle diverse espressioni cliniche della infezione da HCV abbiamo studiato in un gruppo di soggetti HCV positivi suddivisi in portatori asintomatici, pazienti con epatite cronica modesta e pazienti con cirrosi avanzata l'introito dietetico e i carotenoidi nel siero, comparando i risultati alla presenza di addotti del DNA (8-OHdG). Infatti un danno del DNA nei leucociti circolanti era già stato dimostrato già nelle fasi precoci del danno epatico da HCV (Farinati et al., 1999). Dallo studio (ancora non pubblicato) è emerso che i pazienti con cirrosi avevano livelli sierici più bassi e livelli di 8-OHdG più elevati dei portatori asintomatici di HCV. L'introito di carotenoidi con la dieta era, peraltro simile dei tre gruppi. Lo studio è ancora troppo limitato nei numeri per poter offrire delle conclusioni solide. Offre tuttavia alcuni interessanti spunti di studio.

### **Bibliografia**

- ARICÒ, S, CORRAO, G, D'AMICIS, A, KLATSKY, AL AND COLLABORATIVE GESIA AND AISF GROUP. Alcoholic liver cirrhosis after the advent of hepatitis C virus: some reflections on its epidemiology and on the concept of attributable risk. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997,29:75-80
- BELLENTANI, S, TIRIBELLI, C., SACCOCCIO, G, ET AL. Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionisus Study. *Hepatology* 1994,20:1225-1230
- BENVEGNÙ, L, FATTOVICH, G, NOVENTA, F, TREMOLADA, F, CHEMELLO, L, CECCHETTO, A, ALBERTI, A. Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Cancer*, 1994,74:2442-2448.
- BENVEGNÙ, L, PONTISSO, P, CAVALETTO, D, NOVENTA, F, CHEMELLO, L, ALBERTI, A. Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1997,25:211-215
- BRUNO, S, SILINI, F, CROSIGNANI, A ET AL. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 1997,25:754-758
- CHEMELLO, L, ALBERTI, A, ROSE, K ET AL. Hepatitis C serotype and response to interferon therapy. *N Engl J Med* 1994,330:143
- CHIARAMONTE, M, STROFFOLINI, T, VIAN, A, ET AL. Rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with compensated viral cirrhosis. *Cancer* 1999,85:2132-2137
- CRESPO, J, LOZANO, JL, DE LA CRUZ, F, RODRIGO, L, RODRIGUEZ, M, SAN MIGUEL, G, ARTINANO, E, PONS-ROMERO, F. Prevalence and significance of hepatitis C viraemia in chronic active hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 1994,89:1147-1151.
- DI BISCEGLIE, AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997,26:34S-38S

- DIODATI, G, BONETTI, P, TAGGER, A, CASARIN, C, NOVENTA, F, RIBERO, M, FASOLA, M, RUOL, A, REALDI, G. Relationship between serum HCV markers and response to Interferon therapy in chronic hepatitis C: evaluation of HCV genotypes during and after long-term follow-up. *Digestive Dis Sci* 1994,39:2497-2502.
- DONATO, F, TAGGER, A, CHIESA, R, RIBERO, ML, TOMASONI, V, FASOLA, M, GELATTI, U, PORTERA, G, BOFFETTA, P, NARDI, G. Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Italy. *Hepatology* 1997,26:579-584.
- DUSHEIKO, G, SCHEMILOVITZ-WEISS, H, BROWN, D, MCOMISH, F, YAP, PL, SCHERLOCK, S ET AL. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994,19:13-18
- ENOMOTO, N, SAKUMA, I, ASAHINA, Y, KUROSAKI, M, MURAKAMI, T, YAMAMOTO, C. ET AL. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b - Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995,95:224-230.
- ENOMOTO, N, SAKUMA, I, ASAHINA, Y, KUROSAKI, M, MURAKAMI, T, YAMAMOTO, C, ET AL. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b genotype. *N Engl J Med* 1996,334:77-81.
- FARINATI, F, CARDIN, R, DEGAN, P, ET AL. DNA damage in circulating leucocytes occurs as an early event in chronic HCV infection. *Free Radic Biol Med* 1999,27:1284-1291.
- FATTOVICH, G, TAGGER, A, BROLLO, L, GIUSTINA, G, PONTISSO, P, REALDI, G, ALBERTI, A, RUOL, A. Hepatitis C virus infection in chronic hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1991,163:400-402.
- FIGLIORE, G, NAPOLI, N, FERA, G, GIANNELLI, G, PERRICCI, A, LONERO, G, SCHIRALDI, O. Hepatitis C virus infection in anti-HBe positive HBsAg carriers with chronic liver disease. *Digestion* 1991,50:121-126.
- GAETA, GB, RAPICETTA, M, SARDARO, C, SPADARO, A, CHIONNE, F, FRENI, AM, AJELLO, A, COSTANTINO, A, GIUSTI, G. Prevalence of anti-HCV antibodies in patients with chronic liver disease and its relation-ship to HBV and HDV infections. *Infection* 1990,18:277-279.
- GERVAIS A, BACQ, BERNUAU, J, ET AL. Decrease in serum ALT and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2000,32:293-299.
- GONZALES, S, NAVAS, S, MADEJON, A, BARTOLOME, J, CASTILLO, I, MORALEDA, G, MARTIN, J, MARRIOTT, E, HERRERO, M, CARRENO, V. Hepatitis B and D genomes in hepatitis B surface antigen negative patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1995,45:168-173.
- GUADAGNINO, V, STROFFOLINI, T, RAPICETTA, M ET AL. Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of hepatitis c virus infection in the general population. A community-based survey in southern Italian population. *Hepatology* 1997,26:1011-1016
- GRETCH, D, COREY, L, WILSON, J, DELA ROSA, C, WILLSON, R, CARITHERS, JR R, BUSH, M ET AL. Assessment of hepatitis C virus RNA levels by quantitative competitive RNA polymerase chain reaction: high-titer viremia correlates with advanced stage of disease. *J Infect Dis* 1994,169:1219-1225
- GRETCH, D, DELA ROSA, C, CARITHERS, R, WILLSON, R, WILLIAMS, B, COREY, L. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: correlations and clinical implications. *Ann Intern Med* 1995,123:321-329.
- HINO, K, SAINOKAMI, S, SHIMODA, K, IINO, S, WANG, Y, OKAMOTO, H. ET AL. Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1994,42:299-305
- IZUMI, N, ENOMOTO, N, UCHIHARA, M, MURAKAMI, T, ONO, K, NOGUCHI, O, MIYAKE, S, ET AL. Hepatic iron contents and response to interferon- $\alpha$  in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1996,41:989-994
- KANAI, K, KAKOT, M, OKAMOTO, H. HCV genotypes in chronic hepatitis C and response to Interferon. *Lancet* 1992,339:1543
- KAPLOWVIZ N. Mechanisms of liver cell injury *J Hepatol* 2000,32:39-47

- KOBAYASHI, M, TANAKA, E, SODEYAMA, T, URUSHIHARA, A, MATSUMOTO, A, KIYOZAWA, K. The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Hepatology* 1996,23:695-699.
- KOIKE, K, YASUDA, K, YOTSUYANAGI, H, MORIYA, K, HINO, K, KORUKAWA, K, LINO, S. Dominant replication of either virus in dual infection with hepatitis viruses B and C. *J Med Virol* 1995,45:236-239.
- LOBELLO, S. E GRUPPO COLLABORATIVO "STUDIO PIOVENE": Studio epidemiologico sulla diffusione di HCV in popolazione aperta. *Problemi aperti in epatologia, Padova, 23-24 Gennaio 1998 (poster)*.
- MAGRIN, S, CRAXÌ, A, FABIANO, C, MARINO, L, FLORENTINO, G, IACONO, OL, VOLPES, R ET AL. HCV viraemia is more important than genotype as a predictor of response to interferon in Sicily (Southern Italy). *J Hepatol* 1996,25:583-590
- MARTINOT-PEIGNOUX, M, MARCELLIN, P, POUTEAU, M, CASTELNAU, C, BOYER, N, POLIQUIN, M, DEGOTT, C ET AL. Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995,22:1050-1056
- MATHURIN, P, MOUSSALLI, J, CADRANEL, JF, THIBAUT, V, CHARLOTTE, F, DUMOUCHEL, P, CAZIER, J, HURAU, JM, DEVERGIE, B, VIDAUD, M, OPOLON, P, POYNARD, T. Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. *Hepatology* 1998,27:868-873.
- MCOMISH, F, YAP, PL, DOW, BC, ET AL. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994,32:884-892
- NOUSBAUM, JB, POL, S, NALPAS, B, LANDAIS, P, BERTHELOT, P, BRECHOT, C, ET AL. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Ann Intern Med* 1995,122:161-168
- OKAZAKI, T, YOSHIHARA, H, SUZUKI, K, YAMADA, Y, TSUJIMURA, T, KAWANO, K, YAMADA, Y ET AL. Efficacy of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. Comparison between non-drinkers and drinkers. *Scand J Gastroenterol*, 1994,29:1039-1043
- OSHITA, M, HAYASHI, N, KASHAHARA, A, HAGIWARA, H, MITA, E, NAITO, M, KATAYAMA, K ET AL. Increased serum hepatitis C virus RNA levels among alcoholic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 1994,20:1115-1120
- PONTISSO, P, RUVOLETTO, MG, FATTOVICH, G, CHEMELLO, L, GALLORINI, A, RUOL, A, ALBERTI, A. Clinical and virological profiles in patients with multiple hepatitis virus infections. *Gastroenterol*, 1993,105:1529-1533.
- POYNARD, T, BEDOSSA, P, OPOLON, P FOR THE OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR AND DOSVIRC GROUPS. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet*, 1997,349:825-832
- POZZATO, G, KANEDO, S, MORETTI, M, CROCÈ, LS, FRANZIN, F, UNOURA, M ET AL. Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease. *J Med Virol* 1994,43:291-296
- SIMMONDS, P, ALBERTI, A, ALTER, HJ, BONINO, F, BRADLEY, DW, BRECHOT, C ET AL. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994,19:1321-1324.
- STROFFOLINI, T, ANDREONE, P, ANDRIULLI, A, ET AL. Characteristic of hepatocellular carcinoma in Italy. *J Hepatol* 1998,29:944-952
- TAKASE, S, TSUTSUMI, M, KAWAHARA, H, TAKADA, N, TAKADA, A. The alcoholic-altered liver membrane antibody and hepatitis C virus infection in the progression of alcoholic liver disease. *Hepatology* 1993,17:1374-1379
- THIO, CL, THOMAS, DL, CARRINGTON, M. Chronic Viral Hepatitis and the Human genome. *Hepatology* 2000,31:819-827
- TREMOLADA, F, CASARIN, C, ALBERTI, A ET AL. Long-term follow-up of non A non B (type C) post-transfusion hepatitis. *J Hepatol* 1992,16:273-281

- VILLA, E, GROTTOLA, A, BUTTAFOCO, P, TRANDE, P, MERIGHI, A, FRATTI, N, SEIUM, Y, CIONI, G, MANENTI, F. Evidence for hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C with and without serological markers of hepatitis B. *Dig Dis and Sciences* 1995,40:8-13.
- WEINER, AJ, BRAUER, MJ, ROSENBLATT, J, RICHMAN, KH, TUNG, J, CRAWFORDK ET AL. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991,180:842-848
- WEISE, M. Natural course of hepatitis C: a 15 year analysis in an unselected group with an identical parenteral infection. *J Hepatol* 1995,23:89
- WELTMAN, MD, BROTDIARDJO, A, CREWE, EB, FARRELL, GC, BILOUS, M, GRIERSON, JM, LIDDLE, C. Coinfection with hepatitis B and C or B, C and  $\delta$  viruses results in severe chronic liver disease and reponds poorly to interferon - $\alpha$  treatment. *J Viral Hepatitis* 1995,2:39-45.
- YAMADA, G, TAKATANI, M, KISHI, F, TAKAHASHI, M, DOI, T, TSUJI, T, SHIN, S ET AL. Efficacy of interferon alfa therapy in chronic hepatitis C patients depends primarily on hepatitis C virus RNA level. *Hepatology*, 1995,22:1351-1354
- YOSHIOKA, K, KAKUMU, S, WAKITA, T, ISHIKAWA, T, ITOH, Y, TAKAYANAGI, M, ET AL. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alfa therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992,16:293-299
- YUKI, N, HAYASHI, N, KASAHARA, A, HAGIWARA, H, TAKEHARA, T, OSHITA, M, KATAYAMA, K ET AL. Pretreatment viral load and response to prolonged interferon- $\alpha$  course for chronic hepatitis C. *J Hepatol*, 1995,22:457-463
- YUKI, N, HAYASHI, N, HAGIWARA, H ET AL. Hepatitis C virus antibodies and virus replication in asymptomatic blood donors. *Vox Sang* 1994,67:280-285.

**TERAPIA DELL'INFEZIONE DA HCV**

Antonio Craxì, Felice Piccinino

## **LA TERAPIA DELL'EPATOPATIA CRONICA DA HCV**

Alfredo Alberti, Silvia Boccato, Luisa Benvegnù

*Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Padova, Padova*

L'infezione da virus dell'epatite C rappresenta la principale causa di malattia cronica epatica, di cirrosi e di epatocarcinoma in molte parti del mondo, senz'altro in Europa e nel Nord America. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato in 170-200 milioni il numero complessivo dei portatori cronici di HCV. Anche se in molti di questi portatori l'infezione è del tutto asintomatica e poco evolutiva, in circa il 30% dei casi la malattia epatica è progressiva, con sviluppo di cirrosi nell'arco di 10-30 anni ed, eventualmente, di epatocarcinoma.

L'evoluzione della malattia si associa a persistenza virale con attiva replicazione nel fegato ed elevati livelli viremici. Obiettivo della terapia è quindi quello di eradicare il virus o, in alternativa, di almeno bloccare persistentemente l'attività replicativa virale con lo scopo di interrompere o ridurre la progressione della malattia epatica.

Dato che lo sviluppo di cirrosi è legato all'evolvere della fibrosi, mentre la comparsa di epatocarcinoma è preceduta da abnorme proliferazione e da displasia epatocitaria, obiettivi di una terapia efficace sono anche la riduzione della fibrogenesi e della proliferazione cellulare.

La terapia dell'epatite cronica da HCV è oggi basata sull'uso di due farmaci somministrati in combinazione: l'Interferone alfa (IFN) ed un analogo nucleosidico, la Ribavirina.

### **Effetti dell'Interferone alfa nell'epatite C**

L'interferone alfa ha dimostrato effetto antivirale, antifibrotico ed antiproliferativo quando somministrato a pazienti con infezione cronica da HCV.

Non è ancora del tutto chiaro quanto gli effetti sulla fibrosi e sulla proliferazione siano diretti o piuttosto secondari all'effetto antivirale che, determinando la interruzione della replicazione di HCV nel fegato, comporta di conseguenza spegnimento dell'attività necroinfiammatoria che è fattore determinante la fibrogenesi e la proliferazione abnorme delle cellule epatiche. L'interferone alfa dimostra un chiaro effetto antivirale diretto sulla replicazione nel fegato di HCV. Ciò è ben documentato in studi di cinetica virale in corso di trattamento con interferone. Più precisamente, una rapida caduta dei livelli sierici di HCV-RNA è osservabile nei primi due giorni di terapia in molti pazienti con infezione cronica da HCV trattati con dosi adeguate di IFN. Questa prima fase di rapido declino della viremia è seguita o meno da una seconda fase caratterizzata da una cinetica meno rapida. La prima fase è influenzata dalla dose di IFN e ne misura direttamente l'attività antivirale, mentre la seconda fase è espressione dell'attività delle cellule infettate ed è quindi espressione della efficienza nella

eliminazione immunomediata del serbatoio virale nel fegato. Questa fase è molto meno influenzata dalla dose di IFN. La cinetica della prima fase della risposta può essere migliorata aumentando la dose di IFN, o con somministrazione giornaliera, o con l'uso dei nuovi tipi di IFN (PEG-IFN).

### **Effetto della Ribavirina**

La Ribavirina, analogo nucleosidico con ampio spettro antivirale, ma debole attività specifica per HCV, ha dimostrato ben scarsi effetti quando utilizzata in monoterapia. La sua associazione con l'IFN alfa migliora molto la seconda fase cinetica e riduce in modo molto significativo i tassi di recidiva dopo sospensione della terapia. La Ribavirina, pertanto, sembra potenziare l'effetto di IFN principalmente attraverso meccanismi di immunoregolazione favorendo una più rapida, completa ed efficace eliminazione delle cellule epatiche infettate. Ciò avviene prevalentemente se non esclusivamente nei soggetti nei quali l'IFN ha determinato una efficace soppressione della replicazione di HCV.

### **Attuali linee guida per il trattamento della epatite cronica C**

La Consensus Conference Europea su "Epatite C", organizzata dalla Associazione Europea per lo Studio del Fegato a Parigi nel Febbraio 1999 ha definito le linee guida per il trattamento della infezione cronica da HCV e delle diverse forme cliniche associate. Le raccomandazioni EASL, peraltro recepite dalla Commissione Unica del Farmaco (CUF) Italiana nell'ambito del Progetto "IMPROVE", restano sostanzialmente valide a tutt'oggi, pur con alcune perplessità in situazioni specifiche, in attesa di nuove linee guida che seguiranno la registrazione dei nuovi tipi di Interferone alfa (PEG-IFN).

La Consensus Conference EASL ha proposto raccomandazioni sia nell'ambito delle indicazioni al trattamento, sia per quanto concerne i regimi terapeutici più razionali.

Per quanto concerne il primo punto, non è stata data indicazione al trattamento della infezione cronica da HCV nei portatori asintomatici con transaminasi persistentemente normali. In questi casi la malattia epatica è in genere molto lieve e non evolutiva e i dati sulla efficacia del trattamento con IFN sono alquanto contraddittori. La raccomandazione EASL in questi casi è stata pertanto quella di un monitoraggio periodico delle transaminasi, con esecuzione eventualmente di una biopsia epatica qualora si osservi una riattivazione biochimica della malattia. Nei pazienti con transaminasi elevate, la decisione terapeutica è stata vincolata al referto istologico epatico, con raccomandazione certa al trattamento nei pazienti che presentano attività necroinfiammatoria o fibrosi "significativa", in assenza di controindicazioni. Dubbi sono stati invece sollevati sulla opportunità di proporre terapia nei casi con danno epatico minimo, con modesta componente necroinfiammatoria e fibrosi minima o del tutto assente. In questi casi una valida alternativa all'immediato trattamento è

rappresentata da una sorveglianza periodica, con controllo dei valori delle transaminasi e ripetizione della biopsia epatica dopo 4-5 anni allo scopo di identificare i casi con reale progressione della fibrosi.

Sempre secondo le raccomandazioni EASL, la terapia è indicata anche per i casi di cirrosi iniziale, ancora in fase ben compensata e senza importante ipertensione portale.

Controindicazione assoluta alla terapia è invece la presenza di segni attuali o peggiori di scompenso epatico.

Per quanto concerne i regimi di trattamento consigliati, la terapia di combinazione con IFN (alfa) e Ribavirina è stata senz'altro indicata come la terapia standard per l'epatite C, in quanto nettamente più efficace rispetto al solo Interferone. I dosaggi proposti sono stati di 3MU di IFN per tre volte alla settimana in associazione a 1000-1200 mg di Ribavirina, da utilizzare per 6 mesi nei pazienti con HCV-2 o HCV-3 così come nei casi con HCV-1 e "bassa" viremia pre-trattamento (HCV-RNA < 2 MEq/ml con test bDNA), con trattamento invece per 12 mesi nei pazienti con HCV-1 e più "elevata" viremia pre-trattamento. In questi casi è peraltro opportuno controllare l'HCV-RNA sierico con test qualitativo al 6° mese di terapia, sospendendo a questo punto il trattamento nel caso di persistente positività.

In caso di controindicazioni o intolleranza alla Ribavirina, la Consensus Conference EASL propone l'impiego di Interferone alfa in monoterapia a dosi "elevate" (5-6 MU per 3 volte/settimana) per 12 mesi.

Questi schemi di trattamento, proposti nelle raccomandazioni della Consensus Conference EASL, sono stati criticati da alcuni Autori in quanto ritenuti non ottimali in termini di dosaggio di IFN in alcuni sottogruppi di pazienti "difficili". Ciò in riferimento soprattutto ai pazienti infettati con HCV-1b e/o con elevati livelli basali di HCV-RNA. Alcuni Esperti ritengono che tutti i pazienti infettati da HCV-1 dovrebbero essere trattati con IFN e Ribavirina, alle dosi standard, per almeno 12 mesi e la stessa durata di trattamento è stata invocata anche per i soggetti infettati da HCV-2 o HCV-3 che presentano fattori sfavorevoli per la risposta quali un'età superiore a 50 anni o elevati livelli di viremia o importante fibrosi nella biopsia epatica pre-terapia.

Anche la dose di Interferone alfa proposta (3 MU somministrate 3 volte/settimana) è stata da più parti criticata in quanto ritenuta inadeguata in molti pazienti ed in particolare in presenza di HCV-1 e/o di elevati livelli di viremia.

In questi casi l'uso di dosi superiori di interferone (5-6 MU) eventualmente con somministrazione giornaliera piuttosto che trisettimanale, sembra poter migliorare i tassi di risposta in terapia e a lungo termine.

Mancano peraltro a tutt'oggi dati definitivi che permettono di valutare l'entità del guadagno percentuale nella risposta rispetto all'aumento in effetti collaterali e costi della terapia.

La Consensus Conference EASL ha proposto anche alcune raccomandazioni per il ritrattamento di pazienti con epatite cronica da HCV che non hanno risposto in modo adeguato ad un primo tentativo con Interferone. Le raccomandazioni hanno riguardato solo pazienti trattati in prima istanza con monoterapia (IFN) dato che non erano al momento disponibili risultati sul ritrattamento di pazienti che avevano ricevuto come

primo ciclo una terapia di combinazione. Nei pazienti con risposta transitoria durante un primo ciclo di IFN e con recidiva dopo la sospensione della terapia (“relapsers”) è stato proposto un ritrattamento con IFN più Ribavirina per 6 mesi o, nel caso di controindicazioni o intolleranza alla Ribavirina, un ritrattamento con IFN a dosi “elevate” per 12 mesi. In questo ambito, i dati forse più interessanti sono quelli riportati con l’uso di Interferone alfa “consensus” che, in uno studio multicentrico pubblicato da Heathcote nel 1998, raggiungeva tassi di risposta sostenuta del 44% quando utilizzato in monoterapia alla dose di 15 µg per 3 volte alla settimana per 12 mesi in pazienti “relapsers” dopo un primo ciclo di Interferone alfa.

Per quanto concerne infine i pazienti dimostratisi non responsivi durante un primo ciclo con IFN alfa, la Consensus Conference EASL, sulla base dei dati disponibili in letteratura, non ha ritenuto esistano strategie di ritrattamento di provata efficacia.

Anche per quanto concerne i pazienti non responsivi al solo Interferone, si è aperto un ampio dibattito tra esperti con controversie su se e come ritrattare questi pazienti.

Negli Stati Uniti l’FDA ha approvato l’uso in questi casi di Interferone alfa “consensus” (Alfacon) in monoterapia alla dose di 15 µg per 3 volte/settimana per 12 mesi, sulla base di studi che indicano una probabilità di risposta sostenuta dell’11-13%.

Alcuni esperti propongono un ritrattamento con dosi elevate e giornaliere di Interferone alfa, in associazione o meno con Ribavirina, con tassi attesi di risposta virologica a lungo termine, dopo sospensione della terapia, del 15-25%. Recentemente Brillanti e coll. hanno riportato tassi di risposta a lungo termine del 35-45% utilizzando una triplice terapia con Interferone, Ribavirina ed Amantadina.

Risultati incoraggianti sono stati segnalati anche con l’associazione di Interferone ed Istamina. E’ in ogni caso difficile a tutt’oggi proporre uno schema terapeutico di provata efficacia per i pazienti non responsivi all’Interferone. Va poi sottolineato che, con l’introduzione della terapia di combinazione con IFN e Ribavirina come trattamento standard dell’epatite cronica da HCV, sono ormai sempre più numerosi nella pratica clinica i pazienti non responsivi (o relapsers) dopo terapia di combinazione. Per questi pazienti non esistono a tutt’oggi dati su ritrattamenti efficaci, né pertanto linee guida o raccomandazioni a proposito. Recentemente sono stati avviati, in pazienti non responsivi alla terapia di combinazione, studi di ritrattamento con Interferone alfa ad alte dosi giornaliere.

Alcuni dati preliminari sono incoraggianti, ma sarebbe senz’altro prematuro e pericoloso trarre da questi dati preliminari conclusioni sulla possibile efficacia a lungo termine di queste strategie.

### **Variabili associate alla risposta alla terapia**

Numerose sono le variabili che si dimostrano influenzare in modo significativo la probabilità di risposta alla terapia con Interferone o con Interferone e Ribavirina nell’epatite cronica HCV. Queste variabili comprendono: peso corporeo, età, sesso, grado della fibrosi epatica, stato immunitario, e soprattutto il genotipo e la carica virale.

La probabilità di ottenere una risposta primaria ed una risposta mantenuta anche dopo la sospensione della terapia sono nettamente ridotte nei pazienti con HCV-1 e/o con elevata carica virale rispetto ai casi infettati da altri genotipi e/o con bassa viremia.

### **Aspetti controversi**

Gli aspetti più controversi nelle linee guida per il ritrattamento della infezione cronica da HCV riguardano oggi: 1) il trattamento della epatite cronica a minima/moderata attività; 2) il trattamento della cirrosi epatica; 3) la gestione dei pazienti non responsivi all'Interferone; 4) i regimi di terapia per i pazienti più "difficili" ovvero per i casi con genotipo 1b e/o elevata viremia. Per quanto concerne l'epatite cronica a minima/moderata attività vari Autori ne hanno proposto il trattamento sulla base della buona risposta che spesso si osserva in questi casi, con favorevole rapporto costo-beneficio.

Altro punto controverso è quello della terapia del paziente cirrotico, con particolare riferimento alla discussione sulla possibilità che un trattamento con Interferone possa modificare la storia naturale della malattia con riduzione della progressione verso lo scompenso e verso l'epatocarcinoma, eventualmente anche nei casi con risposta solo parziale alla terapia, ovvero con riduzione o normalizzazione delle transaminasi, ma persistenza virale.

In questi casi vari studi, condotti prevalentemente in Giappone, hanno effettivamente evidenziato un ridotto rischio di progressione rispetto a controlli non trattati. La gestione del paziente non responsivo all'Interferone resta peraltro controversa ed ulteriori studi sono senz'altro necessari per meglio definire il ruolo della terapia di combinazione o di nuove strategie terapeutiche in questi casi.

### **Prospettive**

Le prospettive più concrete per un miglior approccio terapeutico alla infezione cronica da HCV riguardano l'introduzione, ormai imminente, delle nuove preparazioni, di Interferone alfa coniugato con glicole polietilenico (PEG). Negli ultimi anni è risultato evidente che la farmacocinetica degli Interferoni alfa disponibili per la terapia dell'epatite cronica da HCV risulta poco favorevole per la breve emivita in circolo del farmaco rispetto alla elevata cinetica virale con breve ciclo replicativo ed emissione in circolo di oltre  $10^{11}$  particelle virali ogni 24 ore. Anche la somministrazione giornaliera di IFN, pur migliorando l'effetto antivirale, non risulta del tutto adeguata nel fornire una continua soppressione dell'attività virale. Sono state pertanto sviluppate nuove preparazioni di Interferone con l'aggiunta di polietilene glicole che ne modifica in modo sostanziale la farmacocinetica, con più lento assorbimento ma soprattutto clearance estremamente rallentata.

Sono stati sviluppati ed ormai ampiamente sperimentati due tipi diversi di PEG-IFN con molecole di 40 Kd e di 12 Kd rispettivamente.

I dati sino ad oggi presentati indicano che questi nuovi tipi di IFN hanno efficacia significativamente maggiore rispetto alle preparazioni standard, quando utilizzati in monoterapia o in terapia di associazioni con Ribavirina.

### **Bibliografia**

- ALBERTI A, ET AL. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 1999,31 (Suppl 1): 17-24.
- BRILLANTI S, ET AL. Triple antiviral therapy as a new option for patients with interferon non responsive chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000,32: 630-634.
- EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatol* 1999,30: 956-961.
- HOOFNAGLE JH, DI BISCEGLIE AM. The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med* 1997,226: 347-356.
- BRUNETTO MR, OLIVERTI F, KOEHLER M: International Interferon- $\alpha$  hepatocellular carcinoma study group. Effect of interferone- $\alpha$  on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *Lancet* 1998,351: 1535-1539.
- LINDAY KL. Different types of interferon. Comparative virological response rates among the different interferons. *J Hepatol* 1999,31(Suppl 1): 232-236
- MARCELLIN P, LÉVY S, ERLINGER S. Therapy of hepatitis C: patients with normal aminotransferase levels. *Hepatology* 1997,26(Suppl 1): 133S-137S.
- MARCELLIN P, ET AL. Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV-RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon- $\alpha$  therapy. *Ann Intern Med* 1997,127: 875-881.
- MCHUTCHINSON JG, ET AL. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998,339: 1485-1492.
- NEUMANN AU, ET AL. Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon- $\alpha$  therapy. *Science* 1998,282: 103-107.
- POYNARD T, ET AL. Randomised trial of interferon  $\alpha$ 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon  $\alpha$ 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998,352: 1426-1432.

## RESISTENZA ALL'INTERFERONE: FATTORI IMPLICATI

Giovanni Raimondo, Giovanni Squadrito, Teresa Pollicino  
*Dipartimento di Medicina Interna, Università di Messina*

La valutazione critica dei trials clinici sull'efficacia terapeutica dell'Interferone, somministrato in monoterapia, nel trattamento dell'epatite cronica da virus C evidenzia una reale efficacia del farmaco solo nel 10-20% dei casi (1). L'uso della terapia combinata Interferone + Ribavirina e, più recentemente, dell'Interferone *pegylato* sembrano sensibilmente incrementare le probabilità di persistente risoluzione della malattia, benché il numero dei *non responders* fra i pazienti trattati rimanga superiore al 50% (2,3).

L'interferone esercita la sua attività antivirale nei confronti dell'HCV attraverso svariati meccanismi che vanno dall'attivazione dei sistemi di sorveglianza immunologica dell'ospite all'induzione di proteine cellulari che agiscono nei confronti del virus degradando gli acidi nucleici ed inibendo la sintesi delle proteine. L'interferone, pertanto, ridurrebbe la produzione di nuovi virioni: incrementando la lisi delle cellule infette, inducendo uno stato antivirale nelle cellule non infette, aumentando la sintesi delle proteine del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC) e la presentazione dei complessi MHC/antigeni virali (4). I motivi per cui la terapia con Interferone fallisce nella maggioranza dei casi di epatite C, nonostante tale complessa e spiccata attività antivirale, rimangono del tutto oscuri.

Fra i fattori che sembrano poter condizionare la mancata risposta alla terapia vi sono l'età del paziente (in verosimile rapporto con la maggiore durata dell'infezione), la presenza di cirrosi, il ceppo infettante appartenente al genotipo virale 1 e la carica virale (5). Tuttavia tali fattori possono essere considerati predittori di probabilità di risposta al trattamento ma sono ben lontani dal condizionare in maniera sicura le scelte terapeutiche dello specialista.

La risposta al trattamento con Interferone è verosimilmente condizionata dall'equilibrio di molteplici fattori alcuni dei quali specifici del virus, altri dell'ospite, altri ancora legati alla contemporanea infezione da differenti agenti patogeni. In questa trattazione verranno affrontati alcuni aspetti relativi alla variabilità dell'HCV (fattore virale), all'assunzione di alcool (fattore dell'ospite) ed alla coinfezione palese o criptica da virus dell'epatite B (HBV).

### Variabilità genomica dell'HCV e risposta all'Interferone

La "*HCV genomic complexity*", intesa come numero di quasispecie virali che infettano ogni singolo paziente, è stata indicata come fattore prognostico di evoluzione delle forme di epatite acuta verso la cronicità e delle epatiti croniche verso la cirrosi (6,7). In analogia, le probabilità di risposta alla terapia interferonica sembrano essere in

rapporto proporzionalmente inverso con la *complessità genomica* del virus (8,9). L'impatto negativo delle quasispecie dell'HCV sul piano clinico – comunque non confermato in maniera unanime in letteratura – viene solitamente spiegato con le maggiori probabilità che in un ampio pool di virus possano essere presenti ceppi dotati di più accentuata patogenicità o perché capaci di eludere la sorveglianza immunologica dell'ospite o perché presentano mutazioni genomiche che conferiscono loro la capacità di interferire con i meccanismi di difesa cellulare. In questo contesto si collocano gli studi condotti nella seconda metà degli anni '90 e concernenti ben definite regioni delle proteine virali NS5A ed E2 (10-12) che, come dimostrato da studi *in vitro*, interagiscono con effetto inibitorio con una proteinchinasi cellulare a spiccata attività antivirale, la *PKR*, la cui sintesi è indotta dall'interferone (12,13). Tali studi sembravano dimostrare che una elevata variabilità delle porzioni genomiche codificanti per dette regioni proteiche correlasse con una positiva risposta al trattamento con interferone in quanto il virus così mutato vedrebbe ridotte le sue possibilità di sfuggire agli effetti antivirali dell'Interferone a causa del mancato legame con la *PKR*. Tuttavia gran parte degli studi successivi sembrano smentire una significativa correlazione fra variabilità genomica di NS5A ed E2 e risposta alla terapia (14-16). In particolare questo emerge da alcuni nostri studi condotti su pazienti con infezione da genotipo 1b dell'HCV che possono essere classificati come *veri* "long term responders" in quanto presentano sia assenza di lesioni al controllo istologico che persistenza di normali valori di transaminasi e negatività dell'RNA virale durante un follow-up medio di 4 anni (17).

### **Assunzione di alcool e risposta all'interferone in pazienti con epatite cronica C**

Numerosi studi clinici hanno ampiamente dimostrato il ruolo negativo svolto dall'alcool nell'evoluzione delle epatiti croniche virus C correlate (5). E' ormai accertato che l'abuso di alcool è in grado di accelerare la progressione della fibrosi e lo sviluppo di cirrosi (18,19). Inoltre i pazienti con cirrosi C, se etilisti cronici, presentano un maggiore rischio di sviluppo di epatocarcinoma (20). I fattori coinvolti nella negativa interferenza esercitata dall'alcool nei confronti della malattia epatica virale sembrano essere diversi. Certamente l'alcool ha un effetto epatotossico diretto che giustifica in parte il suo effetto nocivo; tuttavia esso appare poter influenzare direttamente l'attività replicativa del virus come suggerito dall'osservazione che gli etilisti presentano una maggiore carica virale ed una minore probabilità di risposta al trattamento con Interferone (risposta intesa come scomparsa della viremia HCV) (21,22). I meccanismi attraverso cui l'alcool interferisce con l'attività dell'HCV sono ancora oscuri e si ignora se essi siano legati ad un effetto diretto dell'alcool sul virus o siano una conseguenza delle alterazioni della risposta immune indotte dall'alcool stesso. Un ulteriore aspetto ancora non chiaro ma di notevole importanza è se l'effetto deleterio dell'alcool in corso di epatite da HCV sia limitato ai soggetti etilisti o se l'introduzione anche di modeste quantità possa interferire negativamente con l'attività virale o l'effetto terapeutico dell'interferone.

## Coinfezione da virus B e risposta all'interferone in pazienti con epatite cronica C

Le infezioni da HBV e da HCV condividono le stesse modalità di trasmissione e, di conseguenza, la coinfezione non è rara soprattutto nelle aree dove i due virus sono endemici e fra i soggetti ad alto rischio di infezioni parenterali. Inoltre, molteplici studi dimostrano che l'infezione da HBV può sfuggire alla diagnostica convenzionale per mancata identificazione dell'antigene di superficie nel siero dei pazienti (23-25). Tale infezione criptica appare avere una prevalenza particolarmente elevata proprio fra i soggetti con epatite cronica virus C correlata a dimostrazione che la coinfezione da HBV e HCV è un evento molto più frequente di quanto solitamente ritenuto (26).

Nei casi di coinfezione è verosimile che l'attività biologica di un virus possa essere influenzata da quella dell'altro, e, in particolare, vi sono evidenze che il virus C, a mezzo della sua proteina Core, possa sopprimere la replicazione del virus B (27,28). In realtà, nostri recenti risultati dimostrano che né la variabilità del core dell'HCV né quella dell'intero genoma del virus B sono coinvolte nell'inibizione della replicazione dell'HBV (26,29).

Numerose evidenze indicano che tale coinfezione abbia una particolare rilevanza clinica essendo essa solitamente associata ad epatopatie severe, poco sensibili al trattamento con interferone e ad alto rischio di sviluppo di epatocarcinoma (30-33). E' importante sottolineare come la più rapida evoluzione verso la cirrosi e la scarsa risposta all'interferone si verificano sia nei soggetti HBsAg positivi che nei soggetti portatori di infezione criptica da HBV (26, 34-36).

E' noto che i pazienti HBsAg/anti-HCV positivi possono presentare quadri di attività virale caratterizzati dal prevalere dell'attività replicativa dell'uno o dell'altro virus oppure dalla contemporanea attività od inattività di entrambi. Tali diversi quadri potrebbero rappresentare momenti di una condizione che si modifica nel tempo suggerendo la necessità di appropriati follow up per una più corretta diagnosi eziologica e soprattutto per le più appropriate scelte terapeutiche.

### Bibliografia

1. PAGLIARO, L., PERI, V., LINEA, C., CAMMA, C., GIUNTA, M., AND MAGRIN, S. Natural history of chronic hepatitis C [see comments], *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999,31: 28-44.
2. MCHUTCHISON, J. G., GORDON, S. C., SCHIFF, E. R., SHIFFMAN, M. L., LEE, W. M., RUSTGI, V. K., GOODMAN, Z. D., LING, M. H., CORT, S., AND ALBRECHT, J. K. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group., *N Engl J Med* 1998,339: 1485-92.
3. POYNARD, T., MARCELLIN, P., LEE, S. S., NIEDERAU, C., MINUK, G. S., IDEO, G., BAIN, V., HEATHCOTE, J., ZEUZEM, S., TREPO, C., AND ALBRECHT, J. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT) [see comments], *Lancet* 1998,352: 1426-32.
4. THOMAS, H. C., TOROK, M. E., FORTON, D. M., AND TAYLOR-ROBINSON, S. D. Possible mechanisms of action and reasons for failure of antiviral therapy in chronic hepatitis C, *J Hepatol* 1999,31: 152-9.

5. BOYER, N. AND MARCELLIN, P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C, *J Hepatol* 2000,32: 98-112.
6. FARCI, P., SHIMODA, A., COIANA, A., DIAZ, G., PEDDIS, G., MELPOLDER, J. C., STRAZZERA, A., CHIEN, D. Y., MUNOZ, S. J., BALESTRIERI, A., PURCELL, R. H., AND ALTER, H. J. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies, *Science* 2000,288: 339-44.
7. HONDA, M., KANEKO, S., SAKAI, A., UNOURA, M., MURAKAMI, S., AND KOBAYASHI, K. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease, *Hepatology* 1994,20: 1144-51.
8. ENOMOTO, N., KUROSAKI, M., TANAKA, Y., MARUMO, F., AND SATO, C. Fluctuation of hepatitis C virus quasispecies in persistent infection and interferon treatment revealed by single-strand conformation polymorphism analysis, *J Gen Virol* 1994,75: 1361-9.
9. LE GUEN, B., SQUADRITO, G., NAPLAS, B., BERTHELOT, P., POL, S., AND BRECHOT, C. Hepatitis C virus genome complexity correlates with response to interferon therapy: a study in French patients with chronic hepatitis C, *Hepatology* 1997,25: 1250-4.
10. ENOMOTO, N., SAKUMA, I., ASAHINA, Y., KUROSAKI, M., MURAKAMI, T., YAMAMOTO, C., IZUMI, N., MARUMO, F., AND SATO, C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region, *J Clin Invest* 1995,96: 224-30.
11. ENOMOTO, N., SAKUMA, I., ASAHINA, Y., KUROSAKI, M., MURAKAMI, T., YAMAMOTO, C., OGURA, Y., IZUMI, N., MARUMO, F., AND SATO, C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection, *N Engl J Med* 1996,334: 77-81.
12. TAYLOR, D. R., SHI, S. T., ROMANO, P. R., BARBER, G. N., AND LAI, M. M. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein [see comments], *Science* 1999,285: 107-10.
13. GALE, M. J., JR., KORTH, M. J., TANG, N. M., TAN, S. L., HOPKINS, D. A., DEVER, T. E., POLYAK, S. J., GRETCH, D. R., AND KATZE, M. G. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein, *Virology* 1997,230: 217-27.
14. SQUADRITO, G., LEONE, F., SARTORI, M., NALPAS, B., BERTHELOT, P., RAIMONDO, G., POL, S., AND BRECHOT, C. Mutations in the nonstructural 5A region of hepatitis C virus and response of chronic hepatitis C to interferon alfa, *Gastroenterology* 1997,113: 567-72.
15. ZEUZEM, S., LEE, J. H., AND ROTH, W. K. Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa [see comments], *Hepatology* 1997,25: 740-4.
16. ABID, K., QUADRI, R., AND NEGRO, F. Hepatitis C virus, the E2 envelope protein, and alpha-interferon resistance [comment], *Science* 2000,287: 1555.
17. SQUADRITO, G., ORLANDO, M. E., CACCIOLA, I., RUMI, M. G., ARTINI, M., PICCIOTTO, A., LOIACONO, O., SICILIANO, R., LEVRERO, M., AND RAIMONDO, G. Long-term response to interferon alpha is unrelated to "interferon sensitivity determining region" variability in patients with chronic hepatitis C virus-1b infection [see comments], *J Hepatol* 1999,30: 1023-7.
18. POYNARD, T., BEDOSSA, P., AND OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups, *Lancet* 1997,349: 825-32.
19. WILEY, T. E., MCCARTHY, M., BREIDI, L., AND LAYDEN, T. J. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection, *Hepatology* 1998,28: 805-9.
20. DONATO, F., TAGGER, A., CHIESA, R., RIBERO, M. L., TOMASONI, V., FASOLA, M., GELATTI, U., PORTERA, G., BOFFETTA, P., AND NARDI, G. Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking, and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Italy. Brescia HCC Study, *Hepatology* 1997,26: 579-84.

21. OSHITA, M., HAYASHI, N., KASAHARA, A., HAGIWARA, H., MITA, E., NAITO, M., KATAYAMA, K., FUSAMOTO, H., AND KAMADA, T. Increased serum hepatitis C virus RNA levels among alcoholic patients with chronic hepatitis C, *Hepatology* 1994,20: 1115-20.
22. SCHIFF, E. R. Hepatitis C and alcohol, *Hepatology* 1997,26: 39S-42S.
23. THIERS, V., NAKAJIMA, E., KREMSDORF, D., MACK, D., SCHELLEKENS, H., DRISS, F., GOUDEAU, A., WANDS, J., SNINSKY, J., TIOLLAIS, P., AND ET AL. Transmission of hepatitis B from hepatitis-B-seronegative subjects, *Lancet* 1988,2: 1273-6.
24. LIANG, T. J., BLUM, H. E., AND WANDS, J. R. Characterization and biological properties of a hepatitis B virus isolated from a patient without hepatitis B virus serologic markers, *Hepatology* 1990,12: 204-12.
25. ZHANG, Y. Y., HANSSON, B. G., KUO, L. S., WIDELL, A., AND NORDENFELT, E. Hepatitis B virus DNA in serum and liver is commonly found in Chinese patients with chronic liver disease despite the presence of antibodies to HBsAg, *Hepatology* 1993,17: 538-44.
26. CACCIOLA, I., POLLICINO, T., SQUADRITO, G., CERENZIA, G., ORLANDO, M. E., AND RAIMONDO, G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease, *N Engl J Med* 1999,341: 22-6.
27. SHIH, C. M., LO, S. J., MIYAMURA, T., CHEN, S. Y., AND LEE, Y. H. Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells, *J Virol* 1993,67: 5823-32.
28. SHIH, C. M., CHEN, C. M., CHEN, S. Y., AND LEE, Y. H. Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation, *J Virol* 1995,69: 1160-71.
29. SQUADRITO, G., ORLANDO, M. E., POLLICINO, T., RAFFA, G., RESTUCCIA, T., CACCIOLA, I., DI MARCO, V., SICILIANO, R., PICCIOTTO, A., CRAXÌ, A., AND RAIMONDO, G. Virological profiles in patients with chronic hepatitis C and overt or occult HBV infection., *Submitted*.
30. WELTMAN, M. D., BROTDIHardJO, A., CREWE, E. B., FARRELL, G. C., BILOUS, M., GRIERSON, J. M., AND LIDDLE, C. Coinfection with hepatitis B and C or B, C and delta viruses results in severe chronic liver disease and responds poorly to interferon-alpha treatment, *J Viral Hepat* 1995,2: 39-45.
31. SHIRATORI, Y., SHIINA, S., ZHANG, P. Y., OHNO, E., OKUDAIRA, T., PAYAWAL, D. A., ONO-NITA, S. K., IMAMURA, M., KATO, N., AND OMATA, M. Does dual infection by hepatitis B and C viruses play an important role in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma in Japan?, *Cancer* 1997,80: 2060-7.
32. MAZZELLA, G., SARACCO, G., FESTI, D., ROSINA, F., MARCHETTO, S., JABOLI, F., SOSTEGNI, R., PEZZOLI, A., AZZAROLI, F., CANCELLIERI, C., MONTAGNANI, M., RODA, E., AND RIZZETTO, M. Long-term results with interferon therapy in chronic type B hepatitis: a prospective randomized trial, *Am J Gastroenterol* 1999,94: 2246-50.
33. CHIARAMONTE, M., STROFFOLINI, T., VIAN, A., STAZI, M. A., FLOREANI, A., LORENZONI, U., LOBELLO, S., FARINATI, F., AND NACCARATO, R. Rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with compensated viral cirrhosis, *Cancer* 1999,85: 2132-7.
34. PATERLINI, P., DRISS, F., NALPAS, B., PISI, E., FRANCO, D., BERTHELOT, P., AND BRECHOT, C. Persistence of hepatitis B and hepatitis C viral genomes in primary liver cancers from HBsAg-negative patients: a study of a low-endemic area, *Hepatology* 1993,17: 20-9.
35. HUO, T. I., WU, J. C., LEE, P. C., CHAU, G. Y., LUI, W. Y., TSAY, S. H., TING, L. T., CHANG, F. Y., AND LEE, S. D. Sero-clearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis [see comments], *Hepatology* 1998,28: 231-6.
36. MCMAHON, B. J. Chronic carriers of hepatitis B virus who clear hepatitis B surface antigen are really "off the hook"?, *Hepatology* 1998,28: 265-67.

## TRATTAMENTO DELLA CIRROSI EPATICA

Massimo Colombo, Francesca De Filippi

*Centro Angela Maria & Antonio Migliavacca, V Divisione Medicina Generale e Cattedra di Gastroenterologia, IRCCS Ospedale Maggiore ed Unita' di Ricerca FIRC sul Tumore epatico Università degli Studi di Milano, Milano.*

### Introduzione

La scelta del trattamento di pazienti con cirrosi richiede approfondita conoscenza della storia naturale della malattia e dei fattori che predicono le sue più severe complicanze. La cirrosi da virus C (HCV) è una malattia a lento decorso con tassi di mortalità annua compresi tra 2 e 5%, legati all'insorgenza di complicanze come l'ipertensione portale e l'epatocarcinoma (CE) (1,2). La progressione a scompenso epatico ed epatocarcinoma può essere accelerata da numerosi cofattori solo in parte noti, come età avanzata, sesso maschile, abuso alcolico o concomitante infezione con altri virus epatitici (virus dell'epatite B, HBV) (3-5). Il predittore di tumore più frequentemente identificato è il livello di infiammazione istologica del fegato ed, in particolare la fibrosi (6, 7).

Gli obiettivi del trattamento del paziente con cirrosi epatica correlata sono molteplici. Quello primario è eradicare l'infezione mentre quelli secondari sono la soppressione dell'attività istologica, la riduzione del rischio di scompenso, come la riduzione del rischio di CE ed infine la riduzione della mortalità correlata alla malattia epatica.

### La risposta antivirale

Una meta-analisi di 67 studi randomizzati controllati ha dimostrato l'esistenza di una chiara correlazione dose-risposta sostenuta. Questi studi hanno mostrato ridotta efficacia della terapia con Interferone (IFN) nei pazienti con cirrosi (8) (Tabella 1).

**Tabella 1 -** *Risposta virologica sostenuta in pazienti con cirrosi trattati con interferone alfa.*

Autore, anno	No. Pazienti	Trattamento IFN	Durata della terapia (mesi)	Risposta sostenuta
Nishiguchi et al 1995 <sup>17</sup>	45	6MU	3-6	16%
Australian Study 1997 <sup>18</sup>	56	4.5MU (daily)	6	11%
Serfaty et al 1998 <sup>4</sup>	59	3MU	6-33	5%
Sieck et al 1998 <sup>19</sup>	23	3MU	6	0%

In uno studio multicentrico retrospettivo di 294 pazienti cirrotici trattati in media con 276 MU di IFN per oltre 6 mesi, il 15% dei pazienti dimostrò risposta sostenuta alla terapia (9). In due piccoli studi controllati, il trattamento per 6 mesi con 3-6 MU di IFN a di alterni, produsse risposte sostenute irrilevanti (10, 11).

La risposta antivirale è invece potenziata dal trattamento combinato di IFN con Ribavirina. In un trial controllato in doppio-cieco che includeva 49 pazienti con cirrosi completa e 201 con setti fibrosi, 1/3 dei pazienti dimostrò risposta virologica sostenuta con IFN e Ribavirina rispetto al 10% dei pazienti trattati con solo IFN (12). Gli stessi risultati sono stati riportati in un altro studio multicentrico randomizzato e controllato di simili proporzioni (Tabella 2) (13).

**Tabella 2 -** *Risposta antivirale sostenuta alla terapia combinata IFN+Ribavirina per 48 settimane, in pazienti con cirrosi HCV correlata*

<b>Trattamento</b>	<b>Poynard et al., 1998</b>	<b>McHutchinson, 1998</b>
<i>No. Pazienti</i>		
IFN	48	71
IFN + RIBA	46	55
<i>Risposta sostenuta</i>		
<i>Tutti</i>		
IFN	53 (19%)	27 (12%)
IFN + RIBA	118 (43%)	77 (34%)
<i>Cirrotici</i>		
IFN	5 (10%)	9 (13%)
IFN + RIBA	15 (33%)	21 (38%)
	P=0.02	P<0.001

Questi studi dimostrarono che la frequenza di risposta era genotipo-dipendente cioè migliore (20%) nei pazienti con genotipo 2 o 3 rispetto ai pazienti con genotipo 1 (10%) (14).

Il limite del trattamento combinato è la riduzione della compliance: infatti, il trattamento fu sospeso per comparsa di effetti collaterali nel 19% dei pazienti in terapia combinata rispetto al 13% di quelli in monoterapia.

### **L'effetto sul rischio di scompenso epatico**

Cinque studi hanno valutato l'impatto del trattamento sul rischio di scompenso epatico offrendo però risultati contraddittori. Due studi riportarono risultati favorevoli (4, 15) cioè riduzione della frequenza di scompenso in pazienti trattati con IFN per almeno 6 mesi rispetto ai mai trattati (dopo 4 anni di follow-up 10% vs 40%, rischio relativo 3.14 (15).

Tre altri studi (3,9,11), invece, diedero risultati sfavorevoli, poiché non vi era alcuna differenza statisticamente significativa sulla frequenza di scompenso epatico tra trattati e non trattati.

L'analisi multivariata mostrava che l'assenza di trattamento antivirale era l'unico predittore indipendente di scompenso epatico ed epatocarcinoma (4).

### L'effetto sul rischio di epatocarcinoma

Due studi randomizzati e controllati, ed 11 studi retrospettivi hanno confrontato pazienti trattati con pazienti non trattati (4,7,9,11,16-24). Due altri studi, invece, hanno semplicemente analizzato l'incidenza del tumore epatico in coorti di pazienti trattati (25, 26).

In uno studio prospettico di 2-7 anni l'incidenza di epatocarcinoma fu significativamente minore nei pazienti con epatite cronica o cirrosi trattati con IFN rispetto a pazienti non trattati (4% vs 38%,  $P=0.002$ ), nonostante una bassa percentuale di risposta virologica (16). Altri studi retrospettivi dimostrano che la terapia con IFN riduce l'incidenza di CE solo in pazienti con risposta biochimica (22, 25). In uno studio la percentuale di incidenza cumulativa a sette anni di tumore epatico era del 4% nei pazienti che mostravano una risposta sostenuta o parziale alla terapia rispetto al 26% dei pazienti non-responsivi (25).

Uno studio multicentrico in 2891 pazienti giapponesi, di cui 2400 trattati con una dose cumulativa di 480 Unità di IFN, e seguiti per 54 mesi, riporta sviluppo di CE nel 3.7% dei pazienti trattati rispetto al 12% dei non trattati. Il rischio di CE aumentava in rapporto con la severità della fibrosi epatica, giustificando così l'indicazione al trattamento con IFN del sottogruppo di pazienti con cirrosi (7). Invece, altri studi retrospettivi controllati di pazienti con cirrosi HCV correlata trattati con IFN e seguiti per 5 anni, la probabilità di sviluppare CE non differiva tra pazienti trattati e non trattati (15, 19) (Tabella 3).

**Tabella 3 -** Incidenza dell'epatocarcinoma in pazienti con cirrosi trattati o non trattati con interferone alfa

Pazienti	Fattovich, 1997	Serfaty, 1998	Bonino, 1998	Hu, 1999
No. Trattati	193	59	232	49
No. Non-trattati	136	44	259	63
IFN mu x mese	200	3x6-33	> 3x3	3x6-18
Follow-up, mese	60	48	>36	54
<i>No. Pazienti con CE</i>				
Trattati	9 (5%)	4 (6.6%)	21 (9%)	9 (8%)
Non-trattati	16 (11.5%)	6 (13.1%)	48 (18.5%)	
	ns	$P<0.001$	RR = 3.14	ns
	dopo aggiust.		(1.5-6.8)	

In uno studio retrospettivo multicentrico in 925 pazienti con cirrosi epatica HBsAg e/o anti-HCV sieropositivi trattati con IFN, era stato notato un minor rischio di CE dopo almeno 3 anni di follow-up nei pazienti HCV trattati rispetto ai non trattati (27) a

differenza dei pazienti HBsAg o anti-HCV ed anti-HBc sieropositivi. Questi risultati, tuttavia, devono essere interpretati con cautela vista la natura retrospettiva e non randomizzata degli studi.

E' probabile che anche il ritrattamento con IFN di pazienti con cirrosi HCV correlata riduca l'incidenza di epatocarcinoma. In uno studio dopo 6 anni di follow-up, l'incidenza cumulativa di CE era nulla nei pazienti ritrattati rispetto al 20% circa dei non ritrattati (28). E' possibile che l'interferone riduca il rischio di CE in corso di epatite C per riduzione della proliferazione epatocitaria

### **L'effetto sulla sopravvivenza**

In uno studio francese fu dimostrato che la probabilità di sopravvivenza a 4 anni di pazienti con cirrosi HCV trattati era del 92% rispetto al 63% dei pazienti non trattati ( $P < 0.0001$ ) (4). In un altro studio italiano, la percentuale di morte o di trapianto epatico era maggiore nei cirrotici non trattati rispetto ai trattati (19% vs 4%) (17). Altri due studi, invece, non riportano effetti dell'IFN sulla sopravvivenza dei pazienti (15,19).

### **Conclusioni**

Le discrepanze tra i sopracitati studi circa l'effetto protettivo dell'IFN su scompenso epatico, epatocarcinoma e sopravvivenza, possono avere diverse spiegazioni. La più probabile è che questi studi erano stati disegnati solo per valutare l'efficacia antivirale dell'IFN, senza prendere in considerazione le numerose variabili (predittori) del paziente con cirrosi che determinano il rischio di complicanze. Questo è ben dimostrato dallo studio multicentrico Eurohep (3) nel quale l'IFN sembra proteggere i pazienti dallo scompenso, carcinoma e morte. Tuttavia, questo effetto protettivo scomparve quando i pazienti furono confrontati per le variabili cliniche registrate all'arruolamento. È dunque verosimile che l'eterogeneità clinica della cirrosi ha contribuito a confondere i risultati negli studi di piccole dimensioni, mentre ha lasciato filtrare tendenze positive negli studi di maggiori dimensioni (7,21).

E' indubbio che il trattamento con terapia combinata IFN + Ribavirina porta alla eradicazione sostenuta dell'HCV-RNA in una percentuale di cirrotici, con potenziali benefici clinici. Meno chiaro è se la terapia prolunga la sopravvivenza dei pazienti e diminuisca il rischio di sviluppare CE.

### **Bibliografia**

1. KORETZ, RL. Non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 1993,119: 110-115.
2. COLOMBO, M. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991,325: 675-680.
3. FATTOVICH, G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997,112: 463-472.

4. SERFATY, L. Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1998,27: 1435-1440.
5. BRUNETTO, MR. Hepatocellular carcinoma and multiple hepatitis virus infections. 25<sup>th</sup> *International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund* 1994,20-21.
6. POYNARD, T. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997,349: 825.
7. YOSHIDA, H. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: National surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. *Am J Med* 1999,131: 174.
8. CAMMAA', C. Chronic hepatitis C and interferon alfa: conventional and cumulative meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroent* 1999,94: 581-595.
9. INTERNATIONAL INTERFERON- $\alpha$  HEPATOCELLULAR CARCINOMA STUDY GROUP. The impact of alpha interferon on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma (HCC): a retrospective cohort study of treated versus untreated patients matched for HCC risk factors. *Lancet* 1998,351: 1535-1539.
10. SIECK, JO. Histologically advanced chronic hepatitis C treated with recombinant alpha-interferon: a randomized placebo-controlled double-blind cross-over study. *J Hepatol* 1993,19: 418-423.
11. VALLA, DC. Treatment of hepatitis C virus-related cirrhosis: a randomized, controlled trial of interferon alfa-2b versus no treatment. *Hepatology* 1999,29: 1870-1875.
12. MCHUTCHINSON, JG. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998,339: 1485-1492.
13. POYNARD, T. Randomised trial of interferon  $\alpha$ 2b plus ribarivin for 48 weeks or 24 weeks versus interferon  $\alpha$ 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998,352: 1426-1432.
14. SCHALM, SW. Interferon-Ribavirin for chronic hepatitis C with and without cirrhosis: analysis of individual patient data of six controlled trials. *Gastroenterology* 1999,117: 408-413.
15. HU, KQ. The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States. *Hepatology* 1999,29: 1311-1316.
16. NISHIGUCHI, S. Randomised trial of effects of interferon- $\alpha$  on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. *Lancet* 1995,346: 1051-1055.
17. BENVIGNÙ, L. Retrospective analysis of the effect of interferon therapy on the clinical outcome of patients with viral cirrhosis. *Cancer* 1998,83: 901-909.
18. BRUNO, S. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 1997,25: 754-758.
19. FATTOVICH, G. Effectiveness of interferon alfa on incidence of hepatocellular carcinoma and decompensation in cirrhosis type C. *J Hepatol* 1997,27: 201-205.
20. IKEDA, K. Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: a long-term observation study of 1,346 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *Hepatology* 1999,29: 1124-1130.
21. IMAI, Y. Relation of interferon therapy and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 1998,129: 94-99.
22. MAZZELLA, G. Alpha interferon treatment may prevent hepatocellular carcinoma in HCV-related liver cirrhosis. *J Hepatol* 1996,24: 141-147.
23. OKANOUE, T. Interferon therapy lowers the rate of progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C but not significantly in an advanced stage: a retrospective study in 1148 patients. *J Hepatol* 1999,30: 653-659.
24. NIEDERAU, C. Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology* 1998,28: 1687-1695.
25. KASAHARA, A. Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998,27: 1394-1402.
26. MIYAJIMA, I. The incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C after interferon treatment. *Oncol Rep* 1998,5: 201-204.

27. BONINO, F. Impact of interferon-alpha therapy on the development of hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis: results of an international survey. *J Viral Hep* 1997,4(S2): 79-82.
28. TOYODA, H. The effect of retreatment with interferon-alpha on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Cancer* 2000,88(1): 58-65.

## UN NUOVO MODELLO PER RAPPRESENTARE LA DINAMICA DELLE INTERAZIONI VIRUS-OSPITE NEI PAZIENTI CON EPATITE CRONICA C

Piero Colombatto, L. Civitano, Maurizia Rossana Brunetto, Filippo Oliveri, Barbara Coco, Anna Maria Maina, Pietro Ciccorossi, Ferruccio Bonino.

*Unità Operativa di Gastroenterologia ed Epatologia, Spedali riuniti Santa Chiara, Pisa.*

L'assenza di sistemi in vitro sufficientemente riproducibili ed affidabili per studiare il ciclo replicativo dell'HCV e l'effetto dei farmaci antivirali su di esso, ha favorito lo sviluppo di modelli interpretativi espressi in equazioni matematiche per estrapolare dalle modificazioni dei livelli viremici (misurabili con la determinazione quantitativa dell'HCV-RNA nel siero) alcune informazioni indirette sui parametri (non misurabili) che influenzano la dinamica virale.

Attraverso questo approccio (1) è stato possibile dimostrare come in seguito alla somministrazione di interferone alfa ( $\alpha$ IFN), nei pazienti responsivi, si verifici un blocco della produzione virale che, in funzione della dose, può giungere fino al 96% della produzione basale. L'iniziale rapido declino dei livelli di acido nucleico nel siero (HCV-RNA) osservato dopo 24-48 ore dalla somministrazione dell'IFN fu quindi considerato come la conseguenza di un'emivita dei virioni circolanti molto breve (intorno alle 2,7 ore). Il successivo graduale decremento della carica virale nei pazienti responder fu invece spiegato con una lenta clearance degli epatociti infetti (con produzione virale residua) per effetto della risposta immune.

Nel modello di Neumann (1) il parametro che descrive l'effetto della risposta immune è dato da una costante. Questa condizione, che nel breve termine (primo mese di terapia) è accettabile, successivamente porta come conseguenza che variazioni dei parametri che regolano la dinamica virale si riflettano in un ineluttabile ed illimitato aumento o riduzione della viremia. In effetti in questo modello (1) manca un fattore di controeazione che invece sappiamo esistere dall'analisi dei dati sperimentali ottenuti nei pazienti (prima, durante e dopo la terapia con IFN).

Per ottenere un modello in grado di interpretare i "macrofenomeni" della dinamica virale dell'HCV, applicabile durante l'intera durata della terapia, abbiamo sviluppato un sistema di equazioni differenziali in cui il parametro che descrive l'azione del sistema immune è una funzione positivamente correlata al numero di cellule infette. In questo modo l'efficacia del sistema immune si riduce quando il numero delle cellule infette diventa molto basso (possibile spiegazione del fatto che molti pazienti HCV-RNA negativi durante la terapia recidivano poco dopo la sospensione) ed aumenta quando il loro numero cresce (in virtù di ciò l'estendersi dell'infezione non è totale). Per spiegare come spontaneamente o dopo un trattamento antivirale alcuni pazienti rimangano in remissione prolungata e verosimilmente eradicano l'infezione da HCV, abbiamo contemplato la possibilità che la terapia in questi pazienti attivi un effettore della risposta immune (umorale o cellulare) che non risente della riduzione dei bersagli

(cellule infette) e che può persistere anche dopo la sospensione della terapia. Questi due nuovi parametri possono essere stimati con un'analisi dinamica delle variazioni della viremia quando questa raggiunge livelli inferiori a  $10^3$  IU/ml. Maggiore è l'accuratezza delle misurazioni quantitative dell'HCV-RNA al disotto di questa soglia, migliore sarà la possibilità di determinare il valore preciso dei suddetti parametri e potenzialmente di predire l'efficacia della terapia ed eventualmente la sua durata.

Al momento, sia il modello descritto da Neumann che il nostro sono stati testati su una coorte di 10 pazienti con epatite cronica da HCV trattati con 6-9 MU di IFN alpha 2a a giorni alterni per almeno 6 mesi, di cui erano disponibili i sieri raccolti settimanalmente e congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  nel primo mese di terapia ed era noto il risultato della terapia a 12 mesi dal termine (2). Su questi pazienti, analizzati singolarmente effettuando il "best fitting" dei dati sperimentali con quelli calcolati dal modello, abbiamo verificato come nel primo mese di terapia entrambi i modelli siano in grado di descrivere le cinetiche di caduta della viremia. Dopo tale periodo, invece, la presenza dei parametri della risposta immune introdotti nel nostro modello permette solo ad esso di far collimare i dati osservati con quelli calcolati. Ciò suggerisce che le variabili introdotte interpretino realisticamente quelle presenti in natura e che la loro quantificazione possa aprire la strada ad una più specifica valutazione dell'efficacia del trattamento sul singolo paziente con notevoli vantaggi di qualità (efficacia e rapidità nell'ottenimento della risposta) e riduzione dei costi (riduzione della durata del trattamento inefficace).

### **Bibliografia**

1. NEUMANN, A.U., LAM, N.P., DAHARI, H., GRECHT, D.R., WILEY, T.E., LAYDEN, T.J., PERELSON, A.S. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of Interferon- $\alpha$  therapy. *Science* 1998;282:103-7.
2. COLOMBATTO, P., BALDI, M., OLIVERI, F., RANDONE, A., BONINO, F., BRUNETTO, M.R.. Tailoring interferon dose and monitoring viral load in hepatitis C virus genotype 1b infected patients: a pilot study. *Digestive and Liver Disease* 2000;32:211-6.

## **EPATITE CRONICA C: NUOVE PROSPETTIVE TERAPEUTICHE**

Mario Rizzetto, Valeria Barbon  
*Cattedra di Gastroenterologia, Università di Torino*

L'efficacia della monoterapia con IFN nell'Epatite Cronica C è stata dimostrata dalla metanalisi di numerosi studi clinici.

Tuttavia, la metà dei soggetti che risponde all'IFN durante il trattamento presenta nel follow-up post terapia una recidiva enzimatica e viremica (pazienti relapsers); soltanto il 20-25% dei pazienti trattati mantiene una risposta sostenuta.

L'ulteriore incremento dei dosaggi di IFN non determina un aumento del tasso di risposta mentre induce la comparsa di effetti collaterali maggiori ed aumenta i costi.

Il ri-trattamento con il medesimo protocollo con IFN in pazienti che non hanno avuto una risposta sostenuta dopo un primo ciclo di monoterapia generalmente determina soltanto una risposta temporanea. La comparsa di una risposta sostenuta è soltanto marginale anche quando il dosaggio del farmaco e la durata del trattamento sono aumentati.

### **Nuove strategie terapeutiche**

Considerando il limitato successo della monoterapia convenzionale con IFN, negli ultimi anni sono stati fatti numerosi tentativi per migliorare il tasso di risposta sostenuta, cioè la negativizzazione dell'HCV-RNA e la normalizzazione persistente delle transaminasi per almeno 6 mesi dopo la sospensione del trattamento.

Le nuove strategie terapeutiche si sono sviluppate in 3 direzioni:

1. Manipolazione della monoterapia con IFN- $\alpha$  in modo da ottenere il miglior risultato compatibilmente con la tollerabilità del farmaco
2. Introduzione di nuove molecole di IFN
3. Combinazione della monoterapia interferonica tradizionale con nuovi farmaci che abbiano un'azione sinergica e/o complementare.

### **Nuovi protocolli di monoterapia con IFN**

La somministrazione di 5-6 milioni di unità (MU) di IFN 3 vv/settimana per un anno è diventata in Europa la terapia standard nell'Epatite Cronica C, rispetto ai protocolli iniziali di 3 MU 3 vv/settimana per soli 6 mesi.

Studi per valutare l'impatto sulla cinetica virale di dosaggi maggiori e di somministrazioni quotidiane di IFN hanno suscitato l'interesse clinico per l'accelerata clearance del virus prodotta da questi approcci noti come "terapia di induzione".

Sono stati proposti trattamenti basati sulla somministrazione giornaliera di 10 UI di IFN per 2-4 settimane, seguiti da 5 MU per altre 4-6 settimane e da 3 MU fino al raggiungimento della 24° settimana. I cicli a trattamento giornaliero sono seguiti da 6 mesi di trattamento standard 3 volte/settimana. La ragione che giustifica questo approccio è l'immediata e profonda inibizione del rilascio di HCV da parte degli epatociti durante la fase di induzione, seguita da una fase di mantenimento necessariamente prolungata per permettere il turnover degli epatociti infettati all'inizio del trattamento. Sfortunatamente, nonostante l'immediata caduta della viremia testimoniata da studi clinici in corso, i risultati a lungo termine con la terapia di induzione non hanno prodotto risultati migliori rispetto a quelli ottenuti con i protocolli di trattamento convenzionali.

### **Interferoni alternativi**

Gli IFN alternativi all' $\alpha$ , l'IFN- $\beta$  naturale ed il ricombinante, sono stati utilizzati in Giappone, Spagna ed Italia ed hanno dimostrato una potenziale efficacia.

Studi controllati su larga scala sono in corso ma i risultati non sono ancora disponibili.

Altri IFNs alternativi all'IFN- $\alpha$  sono il Consensus IFN e l' IFN Peghilato.

Il Consensus IFN è una molecola sintetica di 166 aminoacidi ottenuta assemblando i "segmenti attivi" identificati con il computer di numerosi IFN- $\alpha$  naturali. Il farmaco è stato utilizzato ai dosaggi di 3, 9 e 15  $\mu$ g. I risultati nei pazienti mai trattati precedentemente (naives) appaiono simili a quelli ottenuti con IFN- $\alpha$  e la tollerabilità sembra uguale. Il dosaggio di 15  $\mu$ g, ben tollerato e somministrato 3 vv/settimana per 48 settimane, ha determinato una risposta biochimica e virologica sostenuta nel 52% dei pazienti relapsers all'IFN convenzionale o a più bassi dosaggi di Consensus IFN e nel 17% dei pazienti non responders. Recentemente è stato riportato che il Consensus IFN induce risposte anche in pazienti precedentemente non responsivi ad un ciclo di terapia con IFN convenzionale.

L'IFN Peghilato presenta il vantaggio di essere rilasciato lentamente, può essere somministrato in una forma "depot" ed ha un'azione continua e prolungata; viene somministrato una sola volta alla settimana. Rispetto all'IFN convenzionale l'assorbimento è più lento (ritardato di oltre 7 volte), la clearance è ridotta di più di 10 volte e la sua emivita è aumentata di circa 10 volte, con conseguente presenza in circolo del farmaco prolungata e continua dopo una singola dose. La risposta virologica è dose dipendente. Sono stati sviluppati 2 tipi di PEG-IFN che differiscono per il peso molecolare: quello prodotto dalla Roche sulla base dell'IFN- $\alpha$ 2a (Pegasys) misura 40 KDa, quello prodotto dalla Schering-Plough sulla base dell'IFN- $\alpha$ 2b (PEG-Intron) misura 12 KDa. Entrambi si sono dimostrati più efficaci dell'analogo non-peghilato. La risposta virologica sostenuta globale è stata del 39% in 267 pazienti trattati con il Pegasys in monoterapia contro il 19% nei pazienti trattati con l'IFN- $\alpha$ 2a in monoterapia; differenziata per genotipo, la risposta è stata per il genotipo 1 del 28% e 7% e per il

genotipo non 1 del 56% e 37% rispettivamente con il PEG-IFN e con l'IFN convenzionale.

### **Terapia di combinazione**

Fra i trattamenti di combinazione proposti, quelli con acido Ursodesossilico, acetilcisteina e chetoprofene non hanno mostrato vantaggi rispetto alla monoterapia interferonica.

La combinazione con steroidi è potenzialmente pericolosa poiché aumenta il tasso di replicazione virale.

Sembra essere ugualmente dannosa la combinazione con la colchicina che in uno studio ha mostrato una minore risposta al trattamento rispetto al solo IFN.

Più interessante è la combinazione con la timosina  $\alpha$  1 ( $T\alpha_1$ ). In uno studio non controllato  $T\alpha_1$ , somministrata al dosaggio di 1 mg 2 volte/settimana con l'IFN linfoblastoide secondo il protocollo standard, ha indotto una risposta sostenuta in 6 su 15 pazienti trattati (40%). In uno studio controllato  $T\alpha_1$  è stata somministrata al dosaggio di 1,6 mg s.c. 3 volte/settimana per 26 settimane insieme all'IFN standard e l'efficacia di questa combinazione è stata confrontata con la monoterapia interferonica più placebo. Alla fine del trattamento la risposta è stata maggiore nel gruppo trattato con la terapia combinata (37%) ed in tale gruppo si è osservato anche un miglioramento istologico. Tuttavia la risposta sostenuta si è osservata solo nel 14,2% dei casi.

Dati decisamente più concreti e inconfutabili derivano invece dalla terapia di combinazione dell'IFN con la Ribavirina. Il farmaco è assunto per via orale; la sua biodisponibilità è intorno al 40% e si accumula soprattutto negli eritrociti. Somministrata da sola in pazienti con Epatite Cronica C, al dosaggio di 1000-1200 mg/die è in grado di ridurre significativamente i livelli di transaminasi, ma non ha effetto sulla viremia. In combinazione con l'IFN la Ribavirina produce risultati significativamente migliori dell'IFN da solo. Circa il 45% dei pazienti trattati con la terapia di combinazione presenta una risposta biochimica e virologica nei 6 mesi di follow-up post-trattamento. La risposta nei soggetti con genotipo 1 è due volte più alta, rispetto all'interferone da solo, alla 24<sup>a</sup> settimana e tre volte maggiore alla 48<sup>a</sup> settimana di trattamento. La fibrosi sembra essere un fattore prognostico di non-risposta: i pazienti con minor grado di fibrosi hanno risposto meglio di quelli con fibrosi di grado maggiore. L'anemia emolitica è la complicanza più frequente della terapia con Ribavirina; è rapidamente reversibile alla sospensione del trattamento. Altri effetti collaterali sono dispnea, faringite, prurito, nausea e anoressia.

L'efficacia della terapia di combinazione è stata confermata nei pazienti relapser. In uno studio 173 pazienti sono stati trattati con tale terapia, mentre 172 con solo interferone. La combinazione ha aumentato la risposta virologica al 48% (84/173 pazienti), pari a più di 10 volte rispetto alla monoterapia (8/172 pazienti: 4,7%). Il 63% dei pazienti trattati con terapia di combinazione ed il 41% di quelli trattati con la monoterapia ha mostrato miglioramenti istologici. Al termine del follow-up post-terapia il 52% dei pazienti trattati con la combinazione ha mantenuto normali livelli di

transaminasi rispetto al 15% di quelli trattati con solo interferone. La risposta è stata di nuovo migliore nei pazienti con bassa carica virale e genotipo non 1. I risultati della terapia di combinazione nei pazienti non-responder sono meno confortanti: meno del 15% ottiene una risposta a lungo termine. Come prevedibile i migliori risultati si sono ottenuti con la combinazione PEG + Ribavirina. In varie centinaia di pazienti trattati con la combinazione PEG-Intron + Ribavirina la risposta virologica sostenuta globale è stata del 54% contro il 47% della combinazione Intron 3MU 3 vv/settimana + Ribavirina. Il guadagno più significativo è stato nel genotipo 1; hanno risposto il 45% dei pazienti trattati con la combinazione PEG-Intron + Ribavirina contro il 33% dei pazienti trattati con la combinazione Intron A + Ribavirina. Un'ulteriore alternativa potrebbe essere rappresentata dalla triplice combinazione IFN + Ribavirina + Amantadina. In uno studio preliminare in pazienti non-responder all'IFN monoterapia, il 48% di 50 pazienti trattati con la triplice terapia ha eliminato l'HCV-RNA 6 mesi dopo la fine della terapia contro il 5% di quelli trattati con la duplice terapia IFN + Ribavirina.

## SITUAZIONE DEI TRAPIANTI DI FEGATO IN ITALIA

Patrizia Burra, Mario Angelico, Antonio Ascione, Antonina Smedile, Mario Rizzetto  
*AISF - Trapianto di Fegato*

*Con la collaborazione di A. Nanni Costa, Centro Nazionale Trapianti, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Il trapianto di fegato rappresenta una efficace terapia per le malattie epatiche croniche in fase terminale e per forme selezionate di epatite fulminante.

Negli ultimi 10 anni si è assistito ad aumento progressivo del numero di pazienti eleggibili per trapianto di fegato e conseguente sviluppo dei Centri di Trapianto di Fegato, sia come numero (18 su tutto il territorio nazionale) che come attività (Tabella 1, Tabella 2 e Figura 1, su cortese concessione A. Nanni Costa, A. Ghirardini, Centro Nazionale Trapianti, ISS, Roma).

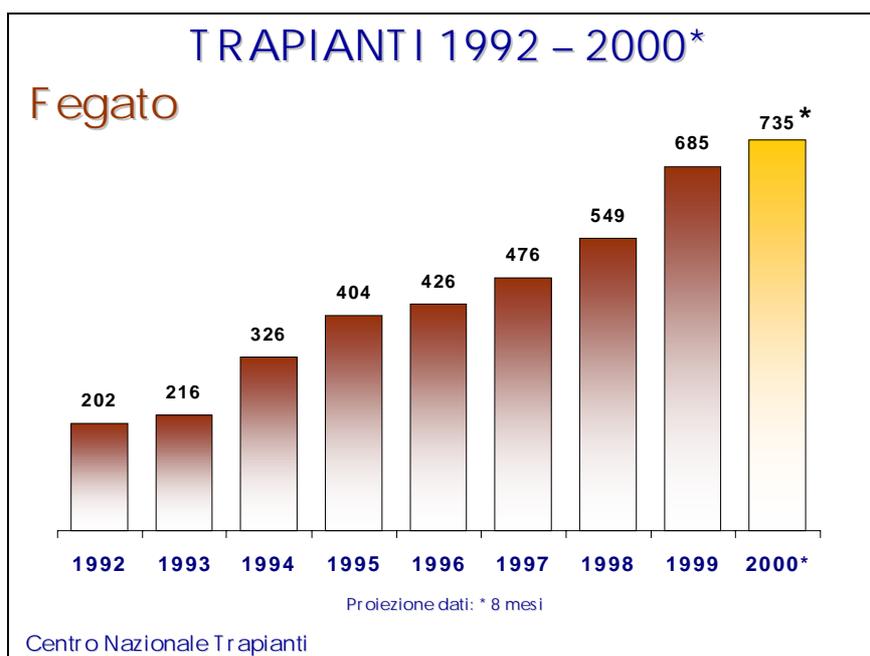
**Tabella 1** - Attività trapianto di fegato per Regione, 1992 – 1 semestre 2000

<b>REGIONE</b>	<b>1992</b>	<b>1993</b>	<b>1994</b>	<b>1995</b>	<b>1996</b>	<b>1997</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>1 sem 2000</b>
Abruzzo - Molise									
Alto Adige									
Basilicata									
Calabria									
Campania	0	3	3	2	3	12	8	16	9
Emilia Romagna	14	26	39	54	58	64	76	95	54
Friuli Venezia Giulia					15	27	30	29	22
Lazio	30	39	53	60	77	58	48	54	40
Liguria	11	14	22	28	27	24	45	47	25
Lombardia	92	75	97	105	96	111	133	155	88
Marche									
Piemonte - Val d'Aosta	20	29	68	94	84	92	101	116	82
Puglia						0	2	8	13
Sardegna									
Sicilia								9	8
Toscana					13	40	44	97	47
Trentino									
Umbria									
Veneto	35	31	44	61	53	45	62	59	42
<b>ITALIA</b>	<b>202</b>	<b>217</b>	<b>326</b>	<b>404</b>	<b>426</b>	<b>473</b>	<b>549</b>	<b>685</b>	<b>430</b>

\*Regioni non dotate di centri di trapianto di fegato

**Tabella 2 - Attività trapianto di fegato per Centro Trapianti, 1992 – 1999**

Regione	Citta'	Centro trapianti	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
Campania	Napoli	Cardarelli Univ.		3	2	1	3	6	8	16
		Federico II				1	1	0	6	0
Emilia Romagna	Bologna	S. Orsola	14	26	39	54	58	64	76	95
Friuli Venezia Giulia	Udine	Osp. Civile					15	27	30	29
Lazio	Roma	Gemelli Policlinico	6	9	11	18	16	12	14	8
		Umberto I	18	17	23	18	30	22	17	28
		S. Eugenio	6	13	19	24	31	24	17	18
Liguria	Genova	S. Martino	11	14	22	28	27	24	45	47
Lombardia	Milano	Ist. Tumori	14	13	14	19	15	13	20	18
		Niguarda Osp.	42	34	46	43	39	45	40	53
		Bergamo Rinuniti Policlinico							7	40
Piemonte - Val d'Aosta	Torino	S. Giovanni Battista Pol.	20	29	68	94	84	92	101	116
Puglia	Bari	Consortziati							2	8
Sicilia	Palermo	ISMETT								9
Toscana	Pisa	S. Chiara					13	40	44	97
Veneto	Padova	Osp. Civile	35	31	44	61	53	45	62	59
<b>ITALIA</b>			<b>202</b>	<b>217</b>	<b>326</b>	<b>404</b>	<b>426</b>	<b>473</b>	<b>549</b>	<b>685</b>



**Figura 1 - Attività trapianto di fegato in Italia, 1992 –2000**

Il Gruppo di Studio Trapianto di Fegato, dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF) ha completato nel 1998 una raccolta dati tra i vari Centri i cui risultati sono stati pubblicati ("Indagine Conoscitiva Centri Trapianto di Fegato in Italia", AISF Roma, Febbraio 1998).

Vengono qui di seguito riassunti i principali punti discussi ed elaborati durante l'indagine.

**Età del candidato al trapianto di fegato**

L'età massima per il candidato al trapianto di fegato è arbitrariamente stabilita a 60 anni. Tale indicazione non ha pertanto valore assoluto, ma relativo alla carenza di organi in Italia per cui si rende opportuno selezionare i candidati anche in base all'età. Sono stati tuttavia eseguiti in Italia trapianti di fegato in pazienti di età superiore ai 60 anni (ad esempio affetti da cirrosi biliare primitiva) con risultati sovrapponibili a quanto rilevato in pazienti di età inferiore ai 60 anni.

**Cirrosi HCV-correlata**

La cirrosi da HCV rappresenta indicazione frequente al trapianto di fegato pur con elevato rischio di recidiva di infezione e/o malattia dopo l'intervento.

A questo proposito è ancora in discussione nel nostro Paese l'efficacia della terapia antivirale. Vengono utilizzati schemi diversi di terapia della ricorrenza di infezione e/o malattia HCV correlata.

Vi è invece una relativa concordanza tra i vari Centri nella riduzione dell'immunosoppressione in questi casi, in particolare degli steroidi.

Un altro aspetto ancora controverso è l'indicazione al ritrapianto in soggetti con recidiva di cirrosi HCV correlata.

**Cirrosi HBV-correlata**

La cirrosi da HBV rappresentava inizialmente indicazione controversa per l'elevato rischio di recidiva di infezione e/o malattia dopo l'intervento.

Da anni invece una prima selezione dei candidati in base alla negatività dell'HBV-DNA e la profilassi nel lungo termine con immunoglobuline anti-HBs ha permesso di considerare soggetti con cirrosi HBV correlata candidati al trapianto di fegato.

Il trattamento post-trapianto con immunoglobuline anti-HBs è adottato da tutti i Centri, con variazioni di schema in termini di posologia, intervalli di somministrazione, modalità di somministrazione e titolo sierico di anti-s da mantenere (200-400 mUI/ml). E' noto come tale terapia sia gravata da costi elevati. In alcuni Centri alle immunoglobuline viene associata lamivudina.

Per la ricorrenza di malattia HBV correlata vengono usati farmaci diversi (lamivudina, ganciclovir, famciclovir).

Anche in questo caso vi è relativa concordanza tra i Centri nella riduzione graduale degli steroidi.

Più complessa è invece la scelta del ritrapianto per ricorrenza di malattia HBV correlata, in quanto i risultati nella maggior parte dei casi non sono soddisfacenti.

I pazienti HDV positivi seguono gli stessi criteri di selezione e profilassi indicati per l'HBV.

### **Patologia epatica alcol-correlata**

La cirrosi ad eziologia alcolica è stata considerata per anni indicazione controversa al trapianto di fegato sia per motivi etici che organici.

I motivi etici sono dovuti alla considerazione che la malattia epatica è autoinflitta e che dopo il trapianto il soggetto potrebbe riprendere le sue abitudini all'uso di bevande alcoliche o dimostrare scarsa "*compliance*" nei confronti della terapia immunosoppressiva.

I motivi organici sono invece dovuti alla presenza di patologie d'organo non sempre facilmente diagnosticabili, che potrebbero influire sulla buona riuscita del trapianto (cardiomiopatia, neuropatia, pancreatite, etc..).

In tutti i Centri vi è uniformità di atteggiamento nella valutazione dei candidati per quanto riguarda il tempo di astinenza richiesto prima del trapianto (6 mesi). Vi sono invece diversità in termini di programmi di selezione dei candidati e di follow-up dopo trapianto, in base alle esperienze dei singoli Centri sulla problematica alcolica.

L'epatite acuta alcolica non viene considerata indicazione al trapianto di fegato.

I casi di recidiva al consumo di alcol dopo trapianto in Italia non sono superiori alla media riportata in altri Centri Trapianto di Fegato in Europa (10-20%). Il ritrapianto non è previsto in linea di principio in questi casi.

### **Neoplasie**

Tra le neoplasie del fegato, sono considerate possibili indicazioni al trapianto gli epatocarcinomi su cirrosi. Il colangiocarcinoma viene considerato controindicazione assoluta per l'elevato rischio di recidiva in breve tempo dopo trapianto.

Vengono ampiamente ma non universalmente accettati i seguenti criteri di selezione di soggetti con epatocarcinoma: cirrosi, singolo nodulo di epatocarcinoma diametro < 5 cm, noduli multipli (1-3) diametro < = 3 cm, non invasione vascolare, non invasione linfonodale, non colonizzazione extraepatica.

### **Altre indicazioni al Trapianto di Fegato**

Sono generalmente accettate le altre indicazioni al trapianto, quali le forme colestatiche (cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante primitiva o secondaria), le forme autoimmuni, le forme metaboliche (emocromatosi, Malattia di Wilson, amiloidosi...), le forme rare (Sindrome di Budd-Chiari).

Per ogni singola patologia vi sono protocolli di selezione dei candidati per escludere la presenza di controindicazioni e protocolli di valutazione di malattie associate (ad esempio osteoporosi nelle forme colestatiche, malattie infiammatorie dell'intestino nella colangite sclerosante primitiva, alterazioni neurologiche nella Malattia di Wilson, malattie ematologiche o linfoproliferative nella Sindrome di Budd-Chiari, etc...).

### **Epatite fulminante**

In questi casi è obbligatorio monitoraggio non solo della funzionalità epatica, ma anche e soprattutto cerebrale, per stabilire l'indicazione, ma anche l'idoneità al trapianto.

Tra le indicazioni vengono considerate: eziologia virale, autoimmune, malattia di Wilson, forme da tossici (farmaci, amanita falloide). Maggiore attenzione in termini diagnostici viene posta per le forme ad eziologia non nota, per escludere controindicazioni assolute al trapianto.

### **Tossicodipendenza**

La tossicodipendenza attiva rappresenta controindicazione al trapianto per la mancanza di "compliance" e per il rischio di infezione da HIV. Tuttavia soggetti con tossicodipendenza pregressa possono essere considerati come possibili candidati. E' indispensabile una selezione accurata secondo criteri che permettano di escludere la persistenza della dipendenza o patologia psichiatrica.

### **Ritrapianto di fegato**

Il ritrapianto è previsto per alcune patologie solitamente ben definite, quali:

1. non funzione primitiva del fegato
2. rigetto iperacuto
3. trombosi vascolare
4. rigetto cronico.

Diverso è l'approccio nei casi con ricorrenza di malattia primitiva, che vengono analizzati singolarmente.

### **Trapianto di Fegato pediatrico**

Il trapianto di fegato in età pediatrica è una realtà che negli ultimi anni va sempre più consolidandosi nei Centri Trapianto Italiani. Le indicazioni più comuni sono:

Atresia vie biliari (60-70% dei casi)

Altre:

Sindrome di Byler, Epatite fulminante, Alagille, Malattie metaboliche, Tumori, Colangite sclerosante, Malattia di Caroli, Cirrosi criptogenetica,

Fibrosi cistica, Fibrosi epatica congenita.

### **Protocolli di valutazione del candidato al trapianto**

Ogni Centro dispone di un protocollo per la valutazione del candidato.

### **Lista d'attesa**

Il problema della definizione e della gestione della lista d'attesa è per ovvi motivi estremamente importante. L'argomento più controverso è quello della priorità, per i numerosi aspetti etici, deontologici ed anche legali ad essa connessi.

La lista d'attesa in alcuni Centri viene gestita dai chirurghi, ma nella maggior parte dei casi dall'equipe chirurghi-epatologi, con la presenza di rappresentanti di altri reparti coinvolti nell'attività trapianto.

La conseguenza più grave delle lunghe liste d'attesa è rappresentata dalla mortalità che varia dal 10 al 30% a seconda dei Centri. La differenza dipende prevalentemente dalle caratteristiche del candidato (classe di Child-Pugh) ossia dal grado di severità della malattia epatica al momento dell'inserimento in lista.

### **Bibliografia**

BURRA, P., SMEDILE, A., ANGELICO, M., ASCIONE, A., RIZZETTO, M. ON BEHALF OF THE STUDY GROUP ON LIVER TRANSPLANTATION OF THE ITALIAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (AISF). Liver Transplantation in Italy: current status. *Digestive Liver Diseases* 2000,32: 249-256.

*Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità  
e Direttore responsabile: Giuseppe Benagiano*

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali  
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988*

*Roma, dicembre 2000 (n. 4) 6° Suppl.*

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici  
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*