

## Epatite C

E. Cariani, A. Albertini

III Laboratorio Analisi, Spedali Civili di Brescia e Cattedra di Chimica Applicata alle Scienze Biomediche, Facoltà di Medicina, Università di Brescia

### 1. Biologia molecolare dell'HCV

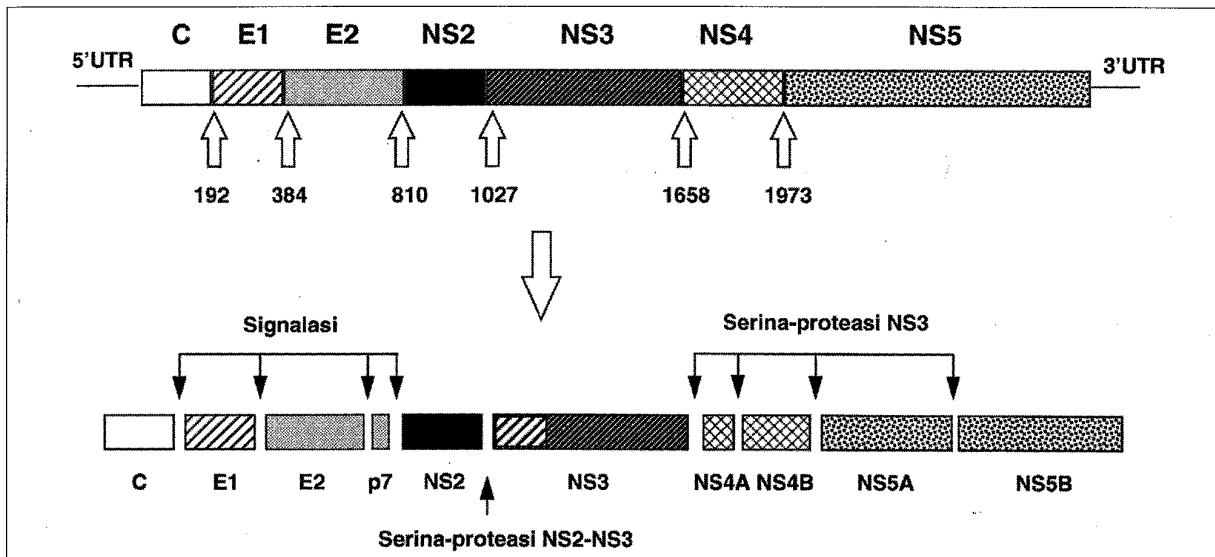
#### a. Struttura e funzione del genoma e delle proteine virali

Il genoma dell'HCV (figura 1) consiste in un RNA a singola catena, a polarità positiva, di circa 9.400 basi, che contiene un'unica *open reading frame* (ORF) codificante per la poliproteina virale, di 3.010-3.030 aminoacidi. In base alla sequenza del genoma virale l'HCV è stato classificato nella famiglia delle Flaviviridae, insieme ai flavivirus ed ai pestivirus.

All'estremità 5' del genoma virale si trova una regione non tradotta di 340 nucleotidi (5'UTR), la cui sequenza è estremamente conservata tra diversi isolati virali. Tale regione, caratterizzata da strutture secondarie importanti per l'inizio ed il controllo

della traduzione, contiene un sito interno di legame con i ribosomi (IRES) che permette la traduzione dell'RNA virale, indipendente dalla presenza di *cap*. Inoltre la 5'UTR lega la polimerasi virale per la sintesi dello strand genomico (strand positivo) e interagisce con la proteina core per l'assemblaggio del nucleocapside virale. La regione non tradotta situata all'estremità 3' dell'RNA virale (3'UTR) potrebbe essere implicata nella replicazione del virus, in particolare nella sintesi dell'intermedio replicativo a polarità negativa (strand negativo). A questo livello avverrebbe il riconoscimento da parte della polimerasi virale ed è stato anche descritto il legame con proteine cellulari (p38 e p57). Recentemente sono stati identificati in questa regione 4 elementi: una breve sequenza estremamente variabile tra i diversi genotipi, una coda di poly(U), una sequenza polipirimidinica ed una regione di 98 nucleotidi, dalla

Figura 1. Rappresentazione schematica del genoma dell'HCV e processazione delle proteine virali.



sequenza conservata. Quest'ultima regione, che termina con una struttura secondaria *stem-loop*, è probabilmente importante per la replicazione virale.

Il genoma dell'HCV codifica per una poliproteina precursore, che viene processata a livello post-traduzionale per dare origine ai singoli polipeptidi virali. Questi ultimi comprendono le proteine strutturali, componenti la particella virale e codificate dalla regione 5' dell'ORF, e le proteine non strutturali, necessarie al ciclo intracellulare del virus e codificate dalla porzione 3' dell'ORF (figura 1). In realtà non tutte le proteine definite come non strutturali hanno una funzione enzimatica nota. Il clivaggio delle proteine strutturali dipende da signalasi cellulari, mentre le proteine non strutturali sono processate dalle serina-proteasi virali. Tra le proteine strutturali, la proteina del nucleocapside o core rappresenta l'estremità N-terminale della poliproteina virale, seguita dalle glicoproteine dell'envelope, E1 ed E2. Il ruolo della proteina p7, recentemente descritta, codificata dal gene E2 e derivata da un precursore E2-p7, è tuttora ignoto.

Le proteine non strutturali (NS2, 3, 4A, 4B, 5A, 5B) sono processate dalle due serina-proteasi codificate dalle regioni NS2 ed NS3. La proteasi NS2-NS3, codificata da parte del gene NS2 e dalla regione 5' del gene NS3, separa la proteina NS2 dall'NS3, mentre la proteasi NS3 agisce sul clivaggio NS3-NS4A e sulla processazione sequenziale di NS5B, NS5A e NS4B.

La struttura delle particelle virali è poco conosciuta, per la mancanza di sistemi efficienti di coltura in vitro. La proteina del nucleocapside (core) è una proteina basica, non glicosilata, che contiene all'estremità N-terminale una sequenza di legame con l'RNA (residui 58-71) e all'estremità C-terminale una sequenza idrofobica. Le sue capacità di legare l'RNA e formare multimeri sono probabilmente correlate all'incapsidazione del genoma ed alla formazione di capsidi virali. Oltre alla sua funzione strutturale, la proteina core potrebbe avere altri ruoli nel ciclo biologico del virus. Al suo interno infatti sono stati identificati uno o più segnali di localizzazione nucleare e forme troncate della proteina sono localizzate a livello del nucleo in sistemi di espressione in cellule, suggerendo un potenziale ruolo nella regolazione genica. In effetti è stata descritta la proprietà della proteina core di sopprimere l'espressione e la replicazione dell'HBV e di regolare l'attività di geni cellulari e virali in vitro. E' stato anche osservato che la proteina core è in grado di cooperare con geni della famiglia H-ras

conferendo un fenotipo trasformato a fibroblasti in coltura. Recentemente, infine, è stata descritta l'interazione tra la proteina core ed il recettore della linfo-tossina  $\beta$ , membro della superfamiglia dei recettori dei *tumor necrosis factor*, coinvolto nella regolazione dello sviluppo del tessuto linfoide periferico e nella formazione dei centri germinativi. La rilevanza biologica di tutte queste funzioni accessorie della proteina core e delle sue forme troncate non è tuttavia ancora accertata.

I prodotti dei geni E1 ed E2 sono, rispettivamente, la gp31 e la gp70, fortemente glicosilate ed entrambe componenti dell'envelope virale. Un eterodimero tra E1 ed E2, per la cui formazione sarebbe essenziale la regione idrofobica C-terminale, è stato osservato a livello del reticolo endoplasmico in sistemi di espressione in cellule di mammifero. La proteina p7, di funzione ignota, deriva da un precursore comune alla gp70 (gp77).

La proteina NS2 ha una funzione ignota e potrebbe essere una proteina strutturale. La sua regione C-terminale si localizza a livello di membrana dove, insieme alla proteasi NS3, è coinvolta nel taglio autocatalitico della giunzione NS2-NS3.

La proteina NS3 contiene due domini distinti: la regione corrispondente agli aminoacidi 1-180 ha attività serina-proteasi, mentre i 465 aminoacidi C-terminali hanno funzione elicasi-ATPasi. La serina-proteasi codificata dalla regione NS3 è caratterizzata da specificità di substrato, necessità di un cofattore virale (proteina NS4A) e importanza strutturale di uno ione zinco, tutte caratteristiche che la rendono un bersaglio ideale per un possibile antivirale. L'attività elicasi della proteina NS3 ha la funzione di srotolare il genoma virale in direzione 3'-5', mentre l'attività NTPasi fornisce l'energia necessaria per questa funzione. Sono stati individuati motivi conservati tra diverse proteine virali con funzione di elicasi, che sarebbero implicati nel legame con i trifosfati, nell'accoppiamento tra idrolisi nucleotidica ed attività enzimatica e nel legame con l'RNA. Il cofattore NS4A, di 54-55 aminoacidi, forma un complesso stabile con la porzione N-terminale della proteina NS3, mentre la proteina NS4B ha funzione ignota e potrebbe complessarsi con NS4A.

NS5A è una fosfoproteina con variabile grado di fosforilazione. Dati recenti indicano che questa proteina potrebbe essere coinvolta, almeno in alcuni isolati virali, nel fenomeno di resistenza all'interferone. Una regione dell'NS5A, denominata *interferon sensitivity determining region* (ISDR), potrebbe legare, inibendo-

la, una proteina chinasi cellulare (PKR) indotta dall'interferone in presenza di RNA bicatenario. La PKR avrebbe la funzione di attivare un substrato cellulare che blocca la sintesi proteica cellulare e virale. Infine, la regione NS5B contiene motivi aminoacidici caratteristici delle RNA polimerasi RNA-dipendenti.

#### b. Eterogeneità genetica dell'HCV

Il genoma dell'HCV, come quello degli altri virus ad RNA, presenta un notevole grado di eterogeneità di sequenza, legata all'assenza di attività *proofreading* da parte dell'RNA polimerasi RNA-dipendente. Tale attività enzimatica infatti permette, in altri tipi di polimerasi, la sostituzione delle basi erroneamente incorporate nel genoma durante la replicazione. Ciò non avviene durante il ciclo replicativo del genoma a RNA dell'HCV, determinando l'insorgenza di variazioni di sequenza distribuite casualmente in ogni segmento del genoma e pari a  $10^{-3}$  sostituzioni per sito per anno. Tuttavia, la frequenza effettiva di mutazioni a livello di un determinato gene è soprattutto legata alla specializzazione funzionale della proteina per cui esso codifica. Infatti, le mutazioni che interferiscono con funzioni essenziali per il ciclo vitale del virus danno origine a una progenie virale con minori capacità replicative ed infettanti, scarsamente rappresentata all'interno della popolazione virale complessiva. Le proteine che non sono sottoposte a stretti vincoli struttura-funzione presentano invece un grado maggiore di variabilità, che può essere a sua volta influenzato dalla pressione selettiva esercitata nel corso dell'infezione dal sistema immunitario dell'ospite. Le sequenze virali che codificano per proteine sottoposte a vincoli strutturali legati al mantenimento di funzioni specifiche (ad esempio il nucleocapside o i domini proteici con funzione enzimatica) sono pertanto notevolmente conservate. In assoluto, le sequenze più costanti del

genoma virale sono quelle che rivestono una funzione regolatrice, come la regione 5'UTR.

L'analisi comparativa della sequenza genomica di isolati HCV ha messo in evidenza l'esistenza di svariati genotipi virali, alcuni dei quali con diversa distribuzione geografica. Sono stati identificati almeno 6 gruppi principali di HCV, ciascuno dei quali comprende svariati sottotipi. La classificazione degli isolati in base all'omologia di sequenza ha permesso di distinguere la percentuale di variabilità nucleotidica tra genotipi (30-40%), sottotipi (15-30%) e singoli isolati appartenenti ad uno stesso genotipo/sottotipo (5-15%). I genotipi HCV hanno una particolare distribuzione geografica (figura 2) e, all'interno di alcune zone, specifiche caratteristiche epidemiologiche. I genotipi principali, 1, 2 e 3, sono praticamente ubiquitari anche se con diversa prevalenza relativa. Il sottotipo 1b è maggioritario in Giappone ed in Europa, mentre negli Stati Uniti prevale il sottotipo 1a. Altri genotipi hanno una distribuzione più ristretta, come il genotipo 4 (Africa Centrale, Medio Oriente), il genotipo 5 (Sud Africa) e il genotipo 6 (Hong Kong, Singapore). All'interno di popolazioni omogenee dal punto di vista della provenienza geografica è possibile delineare l'epidemiologia molecolare dei tipi virali, individuando la distribuzione dei genotipi e sottotipi in diverse classi di età, rischio, durata di infezione. In particolare, nella popolazione italiana si può osservare una prevalenza relativa del genotipo 1, seguito dai genotipi 2 e 3. La prevalenza dei diversi fattori di rischio e l'età media dei soggetti infetti è comunque specifica nell'ambito di ciascun genotipo: i soggetti infettati dal genotipo 2 sono più vecchi e più frequentemente con infezione *community acquired* (con fattori di rischio ignoti), mentre i soggetti con infezione da genotipo 3 sono più giovani e prevalentemente tossicodipendenti (figura 3). Inoltre, nell'ambito del

Figura 2. Distribuzione geografica dei genotipi dell'HCV.

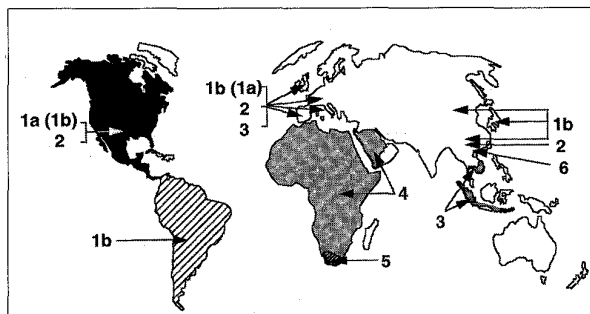
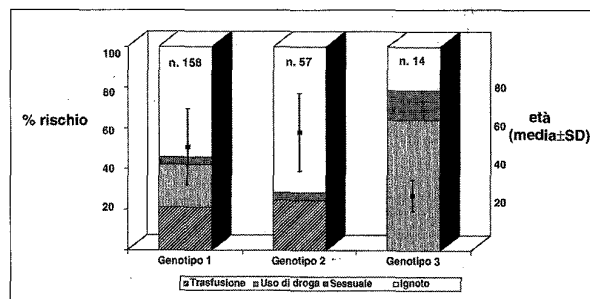


Figura 3. Caratteristiche epidemiologiche dei genotipi 1-3 dell'HCV nel nord Italia.



genotipo 1, il sottotipo 1b ha caratteristiche epidemiologiche simili al genotipo 2, mentre il sottotipo 1a ha distribuzione analoga al genotipo 3. Queste osservazioni indicano che l'epidemiologia dei genotipi HCV sta evolvendo rapidamente con la diffusione di nuovi tipi virali in seguito alla comparsa di nuovi fattori di rischio.

Numerosi studi sono stati diretti ad individuare le possibili implicazioni cliniche dei genotipi dell'HCV. L'interpretazione dei risultati richiede cautela in quanto non sempre sono stati presi in considerazione i possibili fattori confondenti che derivano dalla distribuzione epidemiologica dei genotipi virali nelle popolazioni esaminate. In particolare, è stata segnalata un'associazione tra sottotipo 1b e malattia epatica più grave, con più rapida progressione verso la cirrosi epatica ed il carcinoma epatocellulare. Tuttavia non tutti gli studi sono concordi su questi dati, che potrebbero in parte derivare dalla diffusione del sottotipo 1b in classi di età più elevata e/o con maggiore durata dell'infezione. E' anche stata descritta una maggiore prevalenza di genotipo 2 tra soggetti italiani con infezione cronica e transaminasi persistentemente normali (cosiddetti portatori asintomatici), ma questa osservazione non è stata confermata su casistiche giapponesi. Esiste invece un sostanziale accordo sulla maggiore sensibilità all'interferone dei genotipi "non-1" (in particolare, 2 e 3). Questa osservazione, riproducibile su base statistica, non si è rivelata informativa a livello del singolo paziente, in quanto diverse altre variabili, come durata di infezione, presenza di cirrosi, livelli replicativi, entrano in gioco per determinare le probabilità di successo terapeutico.

L'analisi della sequenza nucleotidica dell'HCV in singoli prelievi ha permesso di isolare una popolazione di sequenze correlate ma eterogenee, definita *quasispecie*. All'interno della quasispecie può essere individuata una sequenza dominante (*master sequence*), che spesso non rappresenta la maggioranza delle varianti presenti e può essere diversa dalla sequenza *consensus*, definita come la sequenza contenente il nucleotide più frequente ad ogni posizione. La presenza nell'ospite di una quasispecie virale, comune ad altri virus a RNA, porta a conseguenze biologiche quali la maggiore frequenza di infezione cronica, che deriva dalla possibile selezione di *escape mutants* resistenti alla risposta immunitaria.

La diversità di sequenza tra isolati di HCV è soprattutto evidente nella regione ipervariabile (HVR),

situata all'estremità aminoterminale della proteina E2. In questa regione, sottoposta a scarsi vincoli struttura-funzione, si possono osservare variazioni praticamente in ciascun paziente, sia all'interno di un singolo prelievo che tra prelievi raccolti in momenti diversi del decorso clinico. Questo ha fatto supporre che la regione in esame sia un importante bersaglio della reazione immunitaria e che l'ipervariabilità di sequenza sia uno dei meccanismi coinvolti nella cronicizzazione dell'infezione o nella mancata risposta alla terapia antivirale. In effetti esperimenti su scimpanzé hanno permesso di rilevare che la regione HVR è bersaglio di anticorpi neutralizzanti, probabilmente isolato-specifici. In questo modo, l'eterogeneità genomica potrebbe rappresentare un meccanismo attraverso il quale il virus elude la sorveglianza immunitaria dell'ospite, favorendo la cronicizzazione e la persistenza dell'infezione attraverso l'emergenza di *escape mutants*. Numerosi studi hanno sottolineato l'importanza della pressione immunitaria nella modulazione del grado di eterogeneità dell'HVR, mostrando che pazienti agammaglobulinemici o immunosoppressi presentano scarse o nulle variazioni di sequenza nel corso del tempo. Il grado di eterogeneità della regione HVR è stato anche implicato nel meccanismo di resistenza all'interferone, in quanto la presenza di multiple sequenze prima del trattamento potrebbe favorire la selezione di mutanti resistenti. A sua volta, la terapia sembra influenzare il grado di eterogeneità della sequenza HVR, accelerandone l'evoluzione e selezionando sequenze omogenee. Nonostante i numerosi studi effettuati, non esistono risultati concordi riguardo alla relazione tra aspetti clinici e variabilità della sequenza HVR. Un grado elevato di eterogeneità è stato infatti descritto anche in soggetti con transaminasi persistentemente normali e lesioni istologiche epatiche lievi. Il profilo di variabilità della sequenza HVR si è dimostrato utile a livello diagnostico in quanto, essendo altamente specifico, può essere utilizzato per identificare l'inoculo infettante implicato nella trasmissione del virus.

Lo studio delle possibili relazioni tra variazioni genomiche e resistenza all'interferone ha recentemente portato all'identificazione di una regione situata all'estremità carbossi-terminale della proteina NS5A, a livello degli aminoacidi 2209-2248. La presenza di sostituzioni aminoacidiche multiple in questa regione, denominata interferon sensitivity determining region (ISDR), sarebbe correlata alla

sensibilità al trattamento. Al contrario, isolati con sequenza conservata sarebbero resistenti alla terapia. Tra i pazienti giapponesi con sequenza mutante il trattamento con interferone porterebbe all'eradicazione dell'infezione nel 70% circa dei casi, mentre solo il 10-15% dei pazienti che non presentano mutazioni nell'ISDR risponderrebbe favorevolmente alla terapia. Questi risultati, peraltro ristretti ai pazienti infettati da genotipo 1b, non hanno trovato finora riscontro in casistiche europee e statunitensi, probabilmente per la scarsa diffusione del genotipo mutante in queste popolazioni. L'impatto clinico di questi risultati e le eventuali correlazioni del genotipo ISDR con altre caratteristiche del virus e dell'ospite importanti per l'esito del trattamento sono tuttora in corso di valutazione.

## 2. Aspetti clinici e diagnostici dell'infezione da HCV

### a. Epidemiologia dell'infezione da HCV

L'infezione da HCV viene trasmessa per via parenterale. Prima dell'introduzione dei tests di screening, la via di trasmissione più efficiente era rappresentata dalle trasfusioni di sangue o emoderivati infetti. Negli ultimi anni si è invece osservata la marcata diminuzione fino quasi all'azzeramento dei casi di epatite C post-trasfusionale. L'HCV può essere trasmesso in seguito a trapianto d'organo da donatore infetto, oppure attraverso l'uso promiscuo di aghi e siringhe, come frequentemente avviene per i tossicodipendenti. È importante notare, tuttavia, che più della metà dei soggetti con infezione da HCV non riporta alcuna causa di esposizione parenterale (infezione sporadica o *community acquired*). Numerosi studi hanno confermato, anche a livello molecolare, l'esistenza di trasmissione intrafamiliare, sessuale e perinatale, anche se queste vie di infezione non sembrano molto efficienti. In particolare la via verticale-perinatale è efficiente quando la madre sia co-infettata da HIV, mentre studi prospettici hanno indicato che la trasmissione materno-infantile dell'HCV interessa non più del 4-5% dei figli di madri anti-HIV negative con infezione attiva da virus C.

La prevalenza di infezione è estremamente variabile nelle diverse zone geografiche. Nei donatori di sangue, i marcatori di infezione sono presenti in meno dell'1% dei casi in Nord Europa, nell'1-1,5% dei casi nell'Europa del Sud e negli Stati Uniti, in percentuali superiori al 5% in Nord Africa. I dati

disponibili sulla popolazione generale sono scarsi. In Italia la prevalenza di marcatori è correlata alle classi di età, essendo pari allo 0,2% a 3-11 anni, allo 0,6% a 14-19 anni ed allo 0,5% tra 19 e 26 anni. In classi di età superiore è stata riscontrata una prevalenza generale del 3%, con picchi molto più elevati in alcune aree del centro-sud. La notevole diffusione dell'infezione nelle classi di età elevata sembra essere correlata a fattori di rischio non più operanti grazie alle migliorate condizioni igienico-sanitarie.

### b. Storia naturale dell'infezione da HCV

#### - Epatite C

L'epatite C ha un periodo medio di incubazione di 7-8 settimane, con variazioni da 2 a 30 settimane ed oltre. L'epatite acuta è raramente sintomatica e generalmente anitterica, con valori picco di transaminasemia spesso inferiori a 1.000 UI/l, eccezionalmente con decorso fulminante. Frequentemente si osserva polifasicità dei valori di transaminasemia, con presenza di diversi picchi nel corso del tempo, soprattutto nei casi destinati ad evolvere a cronicità. Il dato più importante e caratteristico dell'infezione da HCV rispetto alle altre infezioni da virus epatotropi è infatti l'elevata percentuale di cronicizzazione, che può essere superiore al 70%. L'interpretazione dei dati disponibili sulla storia naturale dell'infezione da HCV è complicata dalla frequente assenza di sintomi in fase acuta, che rende difficile stabilire con certezza l'esordio di malattia. Per questo motivo le informazioni fornite dai diversi studi sono limitate e in parte contraddittorie. Uno studio effettuato su 189 donne trattate con immunoglobuline Rho(D) contaminate ha messo in evidenza la comparsa di epatite itterica nel 27% dei casi, di epatite anitterica nel 16% e di infezione acuta asintomatica nel 38%, mentre il 19% non aveva acquisito l'infezione. A distanza di 15 anni il 43% delle pazienti infettate aveva raggiunto una remissione completa, nel 55% era stata messa in evidenza un'epatite cronica persistente e il 2% aveva sviluppato un'infezione cronica con transaminasi normali ed assenza di alterazioni epatiche. È interessante notare che la remissione può essere raggiunta anche in fase cronica: 17 pazienti con evidenza di epatite cronica persistente a 10 anni dall'infezione avevano eliminato il virus 5 anni dopo. Uno studio effettuato su 131 pazienti con epatite post-trasfusionale ha invece identificato una

prognosi più severa, con presenza di epatite cronica nel 21% dei casi, dopo 14 anni in media dalla trasfusione, di epatite cronica attiva nel 23% dei casi, dopo 18 anni, di cirrosi epatica nel 46%, dopo 20 anni e di epatocarcinoma nel 10%, dopo 28 anni.

Nel corso dell'infezione cronica si possono osservare fasi di remissione delle alterazioni bioumorali di variabile durata, intercalate a periodi di attività. La prognosi a lungo termine è generalmente sfavorevole con scarsa tendenza alla remissione stabile, anche se il decorso clinico è spesso molto lento e può compiersi nel corso di decenni. La progressione in cirrosi sembrerebbe meno rapida nelle forme sporadiche, anche se questa osservazione rimane controversa. Si considera che l'infezione da HCV rappresenti attualmente una delle cause principali di carcinoma epatico primitivo nei Paesi occidentali, anche se la cirrosi da HCV non sembra implicare un rischio aumentato di evoluzione maligna rispetto alle cirrosi di altra eziologia.

Con la disponibilità dei test sierologici specifici per l'infezione da HCV, è emersa la presenza di reattività anticorpali contro il virus C in soggetti completamente asintomatici, con valori normali di transaminasemia. Questa osservazione ha sollevato il problema dell'interpretazione di tale riscontro in pazienti, generalmente donatori di sangue, che si sono sottoposti alla determinazione degli anticorpi anti-HCV senza specifiche indicazioni cliniche. Il problema maggiore consiste nella discriminazione delle varie situazioni possibili, quali falsa positività (rara con i test sierologici di nuova generazione), infezione pregressa clinicamente risolta, presenza di infezione virale attiva in fase di quiescenza dal punto di vista bioumorale, stato di portatore cronico senza alterazioni epatiche. A questo proposito è stata segnalata una elevata prevalenza di alterazioni istologiche epatiche in soggetti viremici anche in assenza di elevazioni enzimatiche, osservazione che ha messo in discussione l'esistenza di portatori cronici sani di HCV.

#### - *Patologie associate all'infezione da HCV*

Negli ultimi anni numerosissimi studi hanno messo in evidenza che l'infezione da HCV può essere associata a forme morbose a carico di organi e tessuti extraepatici (tabella 1). In alcuni casi l'associazione con l'infezione da HCV è stata definitivamente confermata, in altri l'associazione è probabile, ma non completamente accertata. Almeno alcune delle patologie più frequentemente riscontrate in corso infe-

zione da HCV potrebbero essere legate al tropismo del virus per le cellule mononucleate del sangue periferico e del midollo, che sembrano essere sede di replicazione virale. Il riscontro di manifestazioni extraepatiche HCV-correlate, derivanti da meccanismi immunologici o da diretta invasione di organi o tessuti da parte del virus, può richiedere accertamenti diagnostici supplementari o specifici provvedimenti terapeutici. Vengono qui elencate alcune situazioni in cui le forme morbose epatiche o extraepatiche che si associano all'infezione da HCV possono influire sugli aspetti clinico-diagnostici.

#### • *Crioglobulinemia mista*

La crioglobulinemia mista essenziale (CME) è caratterizzata dalla triade porpora, artralgia, debolezza, insieme al coinvolgimento di vari organi con glomerulonefrite, neuropatia periferica, vasculite. La sintomatologia si accompagna al riscontro di complessi circolanti di IgG policlonali associati ad IgM monoclonali (crioglobulinemia di tipo II) o policlonali (tipo III) con attività anti-immunoglobuline, simil-fattore reumatoide, che hanno la proprietà di precipitare reversibilmente a bassa temperatura causando una vasculite generalizzata. Numerosi studi hanno dimostrato che la CME è strettamente associata all'infezione da HCV e che crioglobuline di tipo II o III sono presenti in più della metà dei pazienti con epatopatia cronica HCV-correlata. I virioni ed i complessi antigene-anticorpo sono concentrati (10-1.000 volte) nei crioprecipitati, suggerendo un ruolo dell'HCV nella patogenesi della crioglobulinemia e causando spesso la falsa negatività dei test sierologici per anti-HCV in pazienti con CME. Ne consegue l'importanza di sospettare un'infezione da HCV in presenza di crioglobulinemia, anche quando i marcatori anticorpali siano negativi, effettuando la ricerca dell'acido nucleico virale su siero.

**Tabella 1. Manifestazioni extraepatiche associate all'infezione da HCV.**

- 
- Crioglobulinemia mista
  - Glomerulonefrite crioglobulinemica
  - Sialoadenite (s. di Sjögren)
  - Poliartrite
  - Panarterite nodosa
  - Porfiria cutanea tarda
  - Lichen planus
  - Linfoma non-Hodgkin B
-

### • HCV e autoimmunità

Gli anticorpi anti-HCV sono stati osservati in una percentuale elevata di pazienti con autoanticorpi anti-nucleo (ANA), anti-muscolo liscio (SMA) o anti-mitosomi di fegato e rene (anti-LKM<sub>1</sub>). In base al profilo di reattività anticorpali si distinguono due classi fondamentali di epatite cronica autoimmune (EC-AI): l'EC-AI di tipo 1, con anticorpi ANA e SMA, e l'EC-AI di tipo 2, caratterizzata dalla presenza di anti-LKM<sub>1</sub>.

L'associazione tra anti-HCV e autoanticorpi non-organo specifici pone soprattutto dei problemi di ordine terapeutico, per la necessità di operare una scelta tra farmaci antivirali (interferone) e immunosoppressivi (steroidi). L'uso inappropriato dell'interferone è stato associato con epatiti fulminanti, forse attraverso l'induzione di autoantigeni negli epatociti. D'altro lato, il trattamento steroideo può essere dannoso nell'epatite virale. Allo scopo di orientare la scelta terapeutica nei soggetti anti-HCV positivi con reattività autoanticorpali, è stato proposto uno score calcolato in base alle caratteristiche clinico-biochimiche del paziente, al titolo autoanticorpale ed alla presenza dei marcatori di infezione da HCV (anti-HCV, HCV RNA).

### • Porfiria cutanea tarda

La porfiria cutanea tarda ha come base patogenetica una ridotta attività dell'uroporfirinogeno decarbossilasi, su base ereditaria (autosomica dominante) o sporadica. In quasi tutti i casi si osserva la presenza di danno epatico, la cui patogenesi non è mai stata completamente chiarita.

Recentemente, la presenza di anti-HCV, accompagnata o meno dall'acido nucleico circolante, è stata messa in evidenza in una percentuale notevole (dal 60 al 100%) dei pazienti con porfiria cutanea tarda sporadica in Italia, Spagna, Francia e Stati Uniti, mentre l'associazione è molto più rara (3-6%) in Germania. L'infezione da HCV potrebbe giocare un ruolo, insieme ad altri fattori come accumulo marziale ed abuso alcolico, nel causare danno epatico nei pazienti con PCT. Pertanto la possibilità di infezione da HCV dovrebbe essere presa in considerazione nei pazienti con evidenza clinica di porfiria cutanea tarda provenienti da aree geografiche in cui l'associazione tra le due forme morbose è particolarmente frequente.

### c. Test diagnostici per l'infezione da HCV

I test diagnostici disponibili per l'infezione da HCV comprendono varie metodiche immunoenzimatiche per la determinazione di reattività anticorpali contro proteine virali ricombinanti o peptidi.

Non essendo disponibili test per la determinazione di antigenemia, la presenza di viremia HCV viene rilevata in modo indiretto, mediante la ricerca dell'RNA virale. Studi recenti hanno inoltre indicato il potenziale interesse clinico della quantificazione dell'acido nucleico circolante e della caratterizzazione genotipica dell'HCV.

### • Test immunoenzimatici

L'identificazione del genoma dell'HCV ha consentito lo sviluppo di un test diagnostico di prima generazione per la determinazione di anticorpi contro una proteina ricombinante non strutturale dell'HCV (C100), codificata dalla regione NS3-NS4. Il polipeptide è stato espresso in lievito come proteina di fusione con la superossido dismutasi (C100-3) e quest'ultima è stata utilizzata per la determinazione di reattività anti-HCV in una metodica immunoenzimatica (ELISA) di I generazione. Il test ELISA di I generazione ha permesso lo screening su larga scala dei donatori di sangue, contribuendo alla prevenzione dell'epatite post-trasfusionale. Tuttavia, sono stati messi in evidenza diversi limiti di questo test, sia in termini di sensibilità (sierconversione ad anti-C100-3 tardiva e incostante in corso di infezione) che di specificità, con risultati falsamente positivi in pazienti con iperglobulinemia, paraproteinemia, epatiti croniche autoimmuni e soprattutto presenza di autoanticorpi contro la superossido-dismutasi, contenuta nella proteina di fusione utilizzata nel test.

Nei test ELISA di II generazione sono stati introdotti antigeni ricombinanti sia strutturali che non strutturali, codificati dai geni C, NS3, NS4. Tali test hanno consentito di migliorare sia la sensibilità che la specificità rispetto ai saggi di I generazione. Infine i test di III generazione includono antigeni derivati dalla proteina del nucleocapside e dalle regioni non strutturali NS3, NS4 e, in alcuni casi, NS5.

Sono stati formulati anche test supplementari quali gli immunoblot, che permettono di rilevare anticorpi diretti contro le singole proteine ricombinanti. I risultati vengono espressi attribuendo una valutazio-

ne comparativa all'intensità del segnale (da 1+ a 4+). Un campione che riconosca un solo antigene virale viene generalmente considerato come indeterminato al test immunoblot.

La maggiore specificità dei test ELISA di II e III generazione ha permesso di superare la necessità di una conferma dei risultati per i campioni che risultano francamente positivi, tuttavia i test supplementari sono tuttora largamente utilizzati in situazioni cliniche nelle quali può essere utile la determinazione delle singole reattività anticorpali. Inoltre i test supplementari sono utili per confermare i risultati ottenuti nello screening di popolazioni a basso rischio (ad esempio, donatori di sangue) in cui si può verificare una maggiore frequenza di false positività.

Sono stati proposti test per il dosaggio delle risposte IgM anti-core, potenzialmente informativi come marcatori di infezione acuta o, in fase cronica, di danno epatico HCV-indotto, analogamente a quanto avviene nell'epatite cronica da virus B. I test inizialmente proposti erano di scarsa utilità clinica per la loro insufficiente sensibilità. Recentemente sono stati sviluppati test che migliorano notevolmente la soglia di sensibilità, permettendo di rilevare la risposta IgM in fase acuta e nelle infezioni croniche a maggior grado di attività. L'effettiva utilità clinica dei test IgM di seconda generazione è tuttora in corso di valutazione.

#### • *Determinazione qualitativa dell'HCV RNA*

Nell'infezione da HCV la presenza dell'acido nucleico virale nel siero è l'unico test informativo sulla presenza di viremia e, conseguentemente, sulla replicazione del virus. La metodica correntemente utilizzata per la determinazione dell'RNA virale è l'amplificazione enzimatica mediante *polymerase chain reaction* (PCR). Questa metodica permette, mediante variazioni cicliche della temperatura in presenza di una DNA polimerasi termostabile, di aumentare in modo esponenziale il numero di copie della sequenza bersaglio. Una sequenza nota, denaturata, viene ibridata a corte sequenze di DNA sintetiche (*primers* oligonucleotidici), che dirigono la sintesi di una catena complementare di DNA per mezzo della DNA polimerasi. Ad opportune condizioni di temperatura, le sequenze complementari si disappaiano (denaturazione) e sono nuovamente disponibili per l'ibridazione. La ripetizione di diversi cicli successivi di ibridazione-sintesi di DNA-

denaturazione dà origine ad una amplificazione esponenziale delle sequenze di DNA presenti nel campione iniziale. Quando le sequenze bersaglio sono costituite da RNA, come nel caso dell'HCV, si rende necessaria una tappa preliminare di trascrizione inversa, ossia di sintesi di una catena di DNA complementare all'RNA (cDNA).

Date le considerazioni già fatte sull'elevato grado di eterogeneità del genoma dell'HCV, risulta evidente che la scelta della regione da amplificare riveste un'importanza cruciale per la sensibilità della metodica. In base alle informazioni disponibili sulla conservazione dei vari segmenti genomici dell'HCV, la regione generalmente utilizzata come bersaglio della reazione di amplificazione è la 5' UTR, la cui sequenza è notevolmente conservata tra isolati. Per ottenere un maggior grado di sensibilità, alcune metodiche applicano due cicli successivi di amplificazione, utilizzando due coppie di primers l'una interna all'altra (PCR *nested*).

L'elevatissima sensibilità della PCR può generare false positività dovute ad anche minime contaminazioni dei campioni negativi con l'acido nucleico in esame. Questo richiede l'uso di precauzioni operative atte ad evitare le contaminazioni sia in fase preanalitica che nelle fasi successive. Non deve essere peraltro trascurata la possibilità di risultati falsi negativi, legati alla lability dell'RNA o all'utilizzo di protocolli inadeguati di trascrizione inversa-amplificazione. È importante sottolineare che le tappe di raccolta, preparazione e conservazione dei campioni sono un fattore critico per ottenere un risultato attendibile. Infatti per evitare contaminazioni è necessario utilizzare esclusivamente materiale sterile monouso, evitando le micropipette automatiche ad eccezione di quelle ad espulsione positiva. È noto inoltre che una permanenza troppo lunga dei campioni a temperatura ambiente o a 4° può determinare la degradazione dell'RNA virale.

Sono state proposte numerosissime metodiche per la trascrizione inversa-amplificazione, alcune delle quali sono disponibili come kit commerciali. Esistono anche metodi per prevenire le contaminazioni, come il sistema che prevede l'incorporazione di dUTP invece di dTTP durante i cicli di amplificazione e la selettiva degradazione del DNA amplificato ad opera dell'enzima uridil-N-glicosilasi prima delle successive reazioni. È necessario sottolineare l'importanza della tappa di rivelazione del prodotto amplificato, che deve essere adeguata rispetto al protocollo di amplificazione che è stato utilizzato. L'ibridazione dell'amplificato con una sonda interna, prevista in

molti protocolli, consente di migliorare notevolmente la sensibilità e soprattutto la specificità dei risultati. Nonostante i progressi compiuti negli ultimi anni, che hanno permesso un adeguamento delle metodiche alle esigenze del laboratorio diagnostico, studi multicentrici hanno mostrato che la standardizzazione dei metodi basati su PCR per la determinazione dell'HCV RNA non è ancora ottimale, indipendentemente dal metodo utilizzato, e che l'adozione di kit commerciali con sistemi di prevenzione delle contaminazioni non elimina completamente il problema. L'organizzazione di protocolli di controllo di qualità multicentrici potrebbe essere di notevole utilità per ottenere una migliore standardizzazione di questi test.

#### • **Determinazione quantitativa dell'HCV RNA**

Le caratteristiche intrinseche della reazione di PCR non permettono una determinazione attendibile della quantità di acido nucleico presente nel campione in esame. La relazione tra quantità iniziale di substrato e quantità di prodotto non è infatti quasi mai lineare, a causa della variabile efficienza dell'amplificazione, dell'andamento esponenziale della reazione e della possibile presenza di inibitori.

Recentemente sono state proposte diverse metodiche che permettono una valutazione quantitativa dell'RNA HCV secondo due principi alternativi: amplificazione del substrato o amplificazione del segnale. In base al tipo di tecnica utilizzata e del suo grado di sensibilità, variano gli intervalli di viremia all'interno dei quali è possibile ottenere risultati attendibili. Dati i diversi limiti di sensibilità ed intervalli di linearità, i risultati ottenuti con tecniche differenti sono difficilmente confrontabili.

Indipendentemente dal metodo prescelto, le tappe preanalitiche di raccolta e conservazione del campione sono critiche, in quanto la parziale degradazione dell'RNA virale può influire notevolmente sul risultato finale. Anche l'estrazione dell'RNA rappresenta una fase di difficile standardizzazione che può limitare la riproducibilità del metodo. Inoltre, l'efficienza di alcuni metodi di quantificazione può essere influenzata dal genotipo del campione in esame, a causa delle differenze genotipo-specifiche nella sequenza o nella struttura secondaria della regione genomica bersaglio della quantificazione.

I metodi di amplificazione del substrato comprendono svariati protocolli di PCR quantitativa e un sistema di amplificazione isoterma recentemente proposto, che utilizza gli enzimi trascrittasi inversa, T7

RNA polimerasi e RNasi H (*nucleic sequence-based amplification. NASBA*). Nell'ambito dei più noti metodi di PCR quantitativa, quelli che prevedono la determinazione della diluizione limite di substrato ancora amplificabile possono fornire solo informazioni semiquantitative. Anche l'utilizzo di un controllo esterno per la costruzione di una curva standard di riferimento dà come risultato una valutazione semiquantitativa del substrato e non permette di verificare l'efficienza di estrazione e di amplificazione, notoriamente variabili tra i diversi campioni. Per ottenere risultati più attendibili e riproducibili, è necessario utilizzare un controllo interno che consenta il monitoraggio di tutte le fasi della metodica. In base alle caratteristiche della sequenza utilizzata come controllo vengono sfruttati due diversi approcci quantitativi. L'utilizzo di un controllo con sequenza molto simile al substrato porta all'interferenza tra i prodotti di amplificazione di controllo e substrato, dovuta all'ibridazione crociata durante i cicli di PCR ed alla conseguente competizione con i primers (PCR competitiva). In questo modo la sequenza bersaglio e il controllo rimangono in rapporto costante durante l'amplificazione, indipendentemente dal numero dei cicli. Quando invece la sequenza utilizzata come standard non è omologa alla sequenza bersaglio, le due sequenze vengono amplificate indipendentemente (PCR non competitiva).

La tecnica di amplificazione del segnale prescinde dall'uso della PCR ma sfrutta il principio dell'ibridazione molecolare. La molecola bersaglio viene ibridizzata ad una sonda immobilizzata su di un supporto solido, quindi riconsciuta da una seconda sonda HCV, legata ad una molecola sintetica di DNA ramificato. Le ramificazioni contengono molecole di fosfatasi alcalina, che vengono rivelate utilizzando un substrato chemiluminescente.

Il livello di sensibilità conseguito con l'amplificazione del substrato è generalmente maggiore rispetto a quello che può essere ottenuto con l'amplificazione del segnale, che ha un limite inferiore intorno alle  $10^5$  copie di RNA; d'altra parte, quest'ultima tecnica è risultata più riproducibile essendo di più semplice esecuzione ed avendo minori rischi di contaminazione. La possibilità di standardizzare i vari metodi per la quantificazione dell'HCV RNA è oggetto di numerosi protocolli di studio.

#### • **Determinazione dei genotipi dell'HCV**

L'analisi di sequenza rappresenta il metodo di refe-

renza per la determinazione del genotipo/sottotipo dell'HCV, anche se non è praticabile come *routine* diagnostica. Sono state perciò proposte una serie di metodiche che, per le loro caratteristiche di rapidità e semplicità operativa, sono più adeguate per lo screening di campioni clinici. Tra queste metodiche, alcune sono basate sull'amplificazione con primers genotipo-specifici mentre in altre un medesimo amplificato viene ibridizzato con sonde genotipo-specifiche. E' stato anche proposto di determinare il genotipo HCV attraverso lo studio dei polimorfismi di restrizione legati al genotipo.

Un punto importante è rappresentato dalla regione genomica scelta come bersaglio dell'analisi genotipica: una regione dalla sequenza estremamente conservata, come la regione 5'UTR, può essere amplificata dalla maggior parte dei campioni analizzati. Tuttavia, la notevole conservazione di sequenza permette di discriminare specificamente i genotipi principali (che presentano divergenze maggiori) ma non i sottotipi, che in questa regione possono presentare sequenze identiche (come i sottotipi 2a e 2c) o differenti per un solo nucleotide (come i sottotipi 1a e 1b). Al contrario regioni genomiche meno conservate (core, E1, NS5) hanno un'efficienza di amplificazione minore rispetto alla 5'UTR, ma consentono una più specifica discriminazione di tutti i genotipi e sottotipi.

Numerose metodiche sperimentali e commerciali per la determinazione del genotipo HCV si sono dimostrate adeguatamente standardizzate per un uso clinico. In alternativa alla genotipizzazione sono state anche proposte metodiche per la determinazione del sierotipo virale, utilizzando epitopi genotipo-specifici delle proteine core ed NS4. Tali metodiche, che permettono di identificare i principali genotipi, potrebbero rappresentare una valida alternativa per la loro semplicità operativa. La sensibilità e l'attendibilità dei test per la determinazione dei sierotipi HCV sono attualmente in fase di studio.

#### *d. Significato clinico dei test diagnostici*

I diversi marcatori virali disponibili sono stati utilizzati per discriminare i possibili quadri clinici dell'infezione da HCV: fase prodromica, epatite acuta in fase di attività, epatite risolta o cronicizzata, infezione cronica senza segni di necrosi epatocitaria (cosiddetti "portatori asintomatici"), coinfezione con altri virus epatitici, presenza di autoanticorpi in pazienti anti-HCV positivi.

La comparsa di anticorpi contro la proteina NS4 non è un evento precoce nell'epatite acuta da virus C, in quanto si osserva, in media, 15 settimane dopo la comparsa dei sintomi clinici, e può avvenire fino a 6 mesi dopo l'infezione. Inoltre, la reattività anti-NS4 può essere del tutto assente nel 40% circa delle epatiti acute che vanno incontro a remissione. La persistenza di anticorpi anti-NS4 è stata correlata con l'evoluzione cronica dell'infezione, mentre la risoluzione del quadro clinico si accompagna spesso alla perdita degli anticorpi. Tali osservazioni, insieme al riscontro di reattività anti-NS4 nella maggior parte dei pazienti con epatite cronica, ha suggerito che l'anticorpo sia un marker indiretto di infezione attiva.

Gli anticorpi anti-core compaiono molto più precocemente in corso di infezione acuta. Inoltre questi anticorpi permangono più a lungo degli altri anche nel caso di infezione risolta. Quindi la positività isolata per anticorpi anti-core può essere indicativa di fase prodromica dell'infezione o di epatite clinicamente risolta. Anche la reattività anti-NS3 compare precocemente in fase acuta e può talvolta precedere la sierconversione ad anti-core. Si considera che la determinazione combinata di anti-core e anti-NS3 permetta di accorciare la "fase finestra" dell'infezione acuta di 30-90 giorni rispetto ai test di I generazione, contenenti solo l'antigene NS4. L'introduzione della proteina NS5 in alcuni test di III generazione ha lo scopo di ridurre il numero di test indeterminati, anche se non è emerso un particolare significato clinico degli anticorpi anti-NS5. L'interpretazione del pattern anticorpale può quindi fornire indicazioni per la valutazione della fase clinica dell'infezione, anche se esiste una notevole variabilità tra singoli pazienti e nessun marcatore sembra avere un valore prognostico universale. E' evidente che lo stato immunitario del paziente può influire in modo notevole sui tempi di sierconversione e sul pattern anticorpale, con presenza di positività deboli o di infezione sieronegativa in soggetti fortemente immunodepressi.

La presenza di viremia HCV viene determinata attraverso la retrotrascrizione-amplificazione (RT-PCR) dell'RNA genomico nel siero. Questo test fornisce indicazioni cliniche complementari rispetto ai marcatori anticorpali (tabella 2). In pazienti anti-HCV negativi con transaminasi elevate e senza cause note di epatopatia, il test può confermare un'infezione acuta nella "fase finestra" che precede la sierconversione. Infatti l'analisi sequenziale di

campioni sierici di animali infettati sperimentalmente e di pazienti ha dimostrato che la comparsa di viremia determinabile mediante amplificazione è un evento molto precoce nel periodo prodromico. Tuttavia la sensibilità dei test anticorpali di II e III generazione, insieme alla rarità delle infezioni acute sintomatiche, limita la reale utilità pratica del test in questa situazione.

I soggetti con crioglobulinemia mista essenziale, che si associa molto frequentemente all'infezione da HCV, possono risultare falsamente negativi ai test sierologici, in quanto gli anticorpi si concentrano nel crioprecipitato. La determinazione di HCV RNA su siero si è dimostrata più sensibile per la diagnosi di infezione da HCV in questi pazienti.

La ricerca dell'acido nucleico virale può anche essere utile nel caso di alcune categorie di pazienti anti-HCV positivi. Ad esempio, la presenza di anticorpi in soggetti con valori di transaminasi persistentemente nella norma potrebbe indicare un'infezione clinicamente risolta. Tale situazione deve tuttavia essere differenziata dalla condizione di infezione attiva (con positività di HCV RNA sierico) in assenza di alterazioni biochimiche, che si accompagna, nella quasi totalità dei casi, a lesioni istologiche epatiche, generalmente di lieve entità. Anche dopo terapia con interferone, il riscontro di transaminasi nella norma può associarsi alla persistenza dell'acido nucleico virale. Questa situazione è stata correlata con la frequente ripresa, più o meno tardiva, dell'attività di malattia.

Un'altra possibilità diagnostica fornita dalla PCR è la determinazione della trasmissione verticale dell'infezione. Infatti il passaggio transplacentare

degli anti-HCV e la persistenza degli anticorpi nel neonato durante i primi mesi di vita non consente di discriminare i casi di trasmissione mediante i marcatori anticorpali prima di 1 anno di età. Infine, la determinazione dell'HCV RNA può essere utile per risolvere le situazioni dubbie dal punto di vista sierologico.

La determinazione dell'HCV RNA sierico può fornire indicazioni cliniche anche nelle coinfezioni da altri virus epatitici e nei casi con positività associata di anticorpi anti-HCV e autoanticorpi non-organo specifici. Peraltro la presenza di RNA virale in circolo non fornisce di per sé la prova del legame causale tra infezione da HCV e malattia epatica, né consente di valutare in modo indiretto la gravità del danno epatico, che deve essere quantificato e caratterizzato mediante analisi istologica.

L'interesse clinico della determinazione quantitativa dell'HCV RNA è legato al possibile ruolo predittivo del titolo viremico per l'esito del trattamento con interferone. Infatti non è a tutt'oggi emersa alcuna relazione chiara tra livelli di HCV RNA e lo stadio della malattia, la gravità del danno istologico o il potenziale evolutivo dell'infezione. Anche la determinazione del genotipo virale potrebbe rivestire un ruolo nella valutazione pre-trattamento dei pazienti con infezione da virus C. Sono ormai numerosissimi gli studi che hanno infatti correlato statisticamente le caratteristiche del virus (livelli di RNA e genotipo) alla risposta terapeutica. Il potere predittivo di questi test sul singolo paziente è legato ad una valutazione globale che tenga conto anche dei caratteri clinici, biochimici, istologici, oltre che ad un livello adeguato di standardizzazione soprattutto per quanto attiene le determinazioni di tipo quantitativo.

**Tabella 2. Attuali indicazioni cliniche per la determinazione dell'HCV RNA\*.**

**A. Pazienti anti-HCV negativi**

1. *Immunocompromessi con transaminasi elevate ed esclusione di altre cause note di epatopatia*
2. *Con crioglobulinemia mista essenziale*
3. *Con epatite acuta ad etiologia sconosciuta*

**B. Pazienti anti-HCV positivi**

1. *Con transaminasi persistentemente normali*
2. *Figli di madre con infezione da HCV*
3. *Trattati con interferone con transaminasi costantemente normali per oltre un anno dopo il completamento della terapia*

**C. Soggetti con profilo sierologico dubbio**

1. *Positività di tipo "indeterminato" con i test di immunoblotting*
2. *Risultati discordanti ai test ELISA*

\*proposte dalla Commissione "Tecnologie molecolari nella diagnostica delle epatopatie" dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF)

**Bibliografia**

- Alberti A, Morsica G, Chemello L, Cavalletto D, Noventa F, Pontisso P. Ruol A Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet*, 340:697-698, 1992.
- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo Q-L, Kuo G. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 321:1494-1500, 1989.
- Agnello V, Chung RT, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* 327:1490-1495, 1992.
- Bréchet C. Hepatitis C virus: molecular biology and genetic variability. *Dig. Dis. Sci.* 41(suppl.): 6S-21S, 1996.
- Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin. Liver Dis.*, 15:41-63, 1995.

- Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley D W, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362, 1989.
- De Medina M, Schiff ER. Hepatitis C: diagnostic assays. *Semin. Liver Dis.* 15:33-40, 1995.
- Herion D, Hoofnagle JH. The interferon sensitivity determining region: all isolates are not the same. *Hepatology* 25:769-771, 1997.
- Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice C.M. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol.* 70:3363-3371, 1996.
- Müller R. The natural history of hepatitis C: clinical experiences. *J. Hepatol.* 24(suppl. 2):52-54, 1996.
- Ohno T, Lau JYN. The "gold standard", accuracy, and the current concepts: hepatitis C virus genotype and viremia. *Hepatology* 24:1312-1315, 1996.
- Ravaggi A, Rossini A, Mazza C, Puoti M, Marin MG, Cariani E. Hepatitis C virus genotypes in northern Italy: clinical and virological features. *J. Clin. Microbiol.* 34:2822-2825, 1996.
- Scientific Committee "Tecnologie molecolari nella diagnostica delle epatopatie" of the Italian Association for the Study of the Liver - AISF. Molecular diagnostics in hepatitis C virus infection: clinical applications. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.* 29:191-194, 1997.
- Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 21:570-583, 1995.
- Tong MJ, El-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* 332:1463-1466, 1995.