

CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DI ISOLATI DI HCV. STUDIO SU DONATORI DI SANGUE PERIODICI E NUOVI

Maria Rapicetta ¹, Catia Valdarchi ², Anna Rita Ciccaglione ¹, Stefano Dettori ¹, Enea Spada ¹, Paola Chionne ¹, Loreta A. Kondili ¹, Angela Costantino ¹, Claudio Argentini ¹

¹ *Laboratorio di Virologia*, ² *Laboratorio di Epidemiologia e biostatistica - Istituto Superiore di sanità, Roma*

Il rischio di trasmettere l'infezione da virus dell'epatite di tipo C attraverso la trasfusione di sangue si è notevolmente ridotto negli ultimi anni. Ciò è dovuto al progredire delle conoscenze scientifiche che hanno permesso l'aggiornamento dei metodi di screening ed anche alle procedure sempre più accurate di esclusione dei donatori potenzialmente infetti. Tuttavia il rischio, anche se minimo, non è completamente eliminato.

Presso l'Istituto Superiore di sanità esiste un sistema di sorveglianza delle trasfusioni di sangue relativo all'infezione da HIV, al fine di ampliare tale sistema anche all'infezione da HCV, nel 1995 si è deciso di iniziare uno studio pilota con l'adesione volontaria di 87 Centri Trasfusionali.

Con l'obiettivo di valutare la prevalenza degli anticorpi anti-HCV nei donatori periodici e nuovi e determinare le caratteristiche socio-demografiche e i fattori di rischio nei donatori positivi, è stato realizzato un questionario specifico contenente dati sul centro trasfusionale, tipo di donazione, saggi effettuati e criteri di esclusione.

Per l'identificazione degli anticorpi anti-HCV viene normalmente impiegato un saggio immunoenzimatico (ELISA test) basato sulla reattività nei confronti di una miscela di antigeni virali. I campioni positivi vengono quindi confermati tramite un saggio supplementare (RIBA test) che è in grado di evidenziare la presenza di anticorpi verso singoli antigeni virali. Il risultato viene considerato "confermato" solo se il campione mostra una positività nei confronti di almeno due antigeni virali. Al contrario, qualora vi sia positività nei confronti di un solo antigene virale il campione viene considerato "indeterminato" (1).

Per tutti i donatori dello studio pilota, positivi al test anti-HCV ELISA, sono stati raccolti dati relativi al saggio di conferma (RIBA test), dati socio-demografici e fattori di rischio di trasmissione.

Dall'elaborazione dei dati ottenuti dagli 87 Centri Trasfusionali dello studio pilota, distribuiti in 12 regioni italiane (5 al Nord, 4 al Centro e 3 al Sud e Isole) e relativi a 507693 donazioni, risulta che il maggior numero di informazioni sono state ottenute dalle regioni del Nord, e in generale il numero di donazioni ottenute da donatori periodici è risultato maggiore rispetto ai donatori nuovi.

L'analisi dei dati ha messo in evidenza una prevalenza totale di anti-HCV (positivi al test ELISA e confermati al test RIBA) nei donatori pari a 0.062%. All'interno della

popolazione di donatori periodici è stata evidenziata una prevalenza di anti-HCV confermati pari a 0.01%, ed una prevalenza di 0.05% di anti-HCV indeterminati. Tra i donatori nuovi le prevalenze di confermati e indeterminati sono risultate rispettivamente 0.41% e 0.14%.

Il significato dell'alta prevalenza di anti-HCV indeterminati tra i donatori, rimane ancora un fenomeno incompreso. Una ipotesi possibile, che può spiegare almeno in parte questo dato, è che la mancanza di reattività anticorpale verso uno o più antigeni presenti nel saggio di conferma RIBA possa essere attribuita alla variabilità dell'isolato HCV infettante un determinato individuo.

Il virus dell'HCV è infatti un virus ad RNA con elevata variabilità presente sotto forma di 6 genotipi distinti a vari sottotipi con possibile differente significato patogenetico (2) e classificati proprio in base alla loro distanza genetica. Il saggio di conferma RIBA contiene antigeni ricombinanti che corrispondono al solo genotipo HCV 1a. La possibilità che la variabilità virale possa spiegare l'esistenza di individui infetti ma reattivi in maniera "incompleta" al test RIBA, rende necessari studi di virologia molecolare volti ad evidenziare possibili relazioni tra variabilità virale e differenze nella reattività anticorpale.

A tale proposito noi abbiamo eseguito una indagine epidemiologica su una popolazione generale di un piccolo centro del Sud Italia, Sersale (3-5). In questa popolazione, ben campionata, abbiamo riscontrato un'elevata prevalenza di anti-HCV confermati, pari al 12.6%. Tale prevalenza elevata rende i dati ottenuti, nell'ambito di questa indagine, significativi e affidabili. La determinazione dell'HCV-RNA nei soggetti ELISA positivi ha rilevato la presenza dell'acido nucleico virale nel 17.4% degli anti-HCV indeterminati. Questo risultato conferma la specificità per HCV di questi campioni indeterminati e rafforza l'ipotesi della variabilità genotipica come possibile causa responsabile del pattern di "indeterminazione".

Uno dei metodi per identificare il genotipo HCV si basa sull'amplificazione mediante PCR di una regione dell'HCV-RNA corrispondente a parte del Core dell'HCV. La metodica prevede la realizzazione di una prima PCR condotta con primers universali, cioè che riconoscono tutti i genotipi virali, e una seconda PCR realizzata sullo stampo della prima eseguita con una mix di primers specifici per ognuno dei 5 genotipi più diffusi. Poiché tale metodica, non identifica il genotipo 2c, abbiamo ottimizzato le condizioni sperimentali e aggiunto un primer specifico per rilevare questo genotipo diffuso in Italia (6). La specificità della metodica è stata valutata su una popolazione di 107 soggetti HCV positivi e i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti utilizzando un saggio di genotipizzazione commerciale quale l'Innolipa. I risultati ottenuti indicano una concordanza tra i due metodi del 98.9%. Inoltre, 13 dei 26 campioni 2c identificati mediante la nuova metodica, sono stati sequenziati e l'analisi filogenetica ha mostrato il loro raggruppamento nel "cluster" in cui cadono i genotipi 2c di riferimento (6).

Impiegando la metodica di genotipizzazione per PCR da noi messa a punto, abbiamo identificato nella popolazione di Sersale una distribuzione dei genotipi simile a quella

osservata nei donatori di sangue, in cui i sottotipi 1b e 2c sono quasi equamente rappresentati, costituendo il 50.7% e il 44.6% (1). L'analisi della reattività nei confronti dei singoli antigeni presenti nel test RIBA rispetto al genotipo, ha messo in evidenza una differenza significativa tra il genotipo 2c e 1b per quanto riguarda la reattività all'antigene C-100, che rimane significativa anche calcolando l'età, il sesso e il livello di istruzione.

Il mancato rilevamento con test RIBA di infezioni da HCV sostenute da determinati isolati, già riportato per il genotipo 3 e 2, ma non per il 2c, riveste un'importanza diagnostica in quanto può portare ad una sottostima della prevalenza di HCV nei donatori.

Un'analisi più approfondita dei risultati del test RIBA ottenuti per i campioni 2c di Sersale ha messo in evidenza questa problematica (3). Infatti se si esamina l'intensità della reattività nei confronti degli antigeni del RIBA, si può osservare che il 70% dei soggetti infettati con genotipo 1b presenta una intensità della reattività anticorpale all'antigene C-100, pari a +4. Al contrario, solo il 40% dei soggetti con genotipo 2c presenta la stessa intensità di risposta verso l'antigene C-100 e circa il 40% non mostra alcuna reattività anticorpale verso questo antigene.

Allo scopo di stabilire il contributo dato dalla variabilità dell'HCV nel determinare le differenze nelle reattività anticorpali, che spinte all'estremo potrebbero portare al pattern "indeterminato", abbiamo proseguito lo studio sui donatori di sangue afferenti allo studio pilota, pianificando la raccolta, con un follow-up di almeno 12 mesi, di campioni di siero provenienti da soggetti ELISA +, RIBA indeterminati. Gli obiettivi sono quelli di evidenziare eventuali fluttuazioni nei livelli anticorpali verso antigeni virali nel corso del follow-up e studiare l'eventuale coinvolgimento di particolari ceppi di HCV in queste infezioni. Il coinvolgimento di più centri afferenti al programma di sorveglianza rende questi studi particolarmente validi.

Per la caratterizzazione molecolare degli isolati di HCV abbiamo standardizzato una metodica di rilevamento dell'HCV-RNA ad elevata sensibilità (7). Tale metodica oltre alle prime II fasi canoniche di amplificazione per PCR, prevede una III fase in cui viene impiegato un primer, opportunamente scelto, la cui sequenza è conservata in tutti gli isolati.

Utilizzando questa tecnica abbiamo identificato tra i donatori indeterminati un campione positivo, che l'analisi di sequenza e l'Innolipa hanno classificato come 1b.

Gli studi proseguiranno con la raccolta di casi provenienti da altri Centri Trasfusionali afferenti al programma di sorveglianza in modo da avere un numero significativo di follow-up sierologici.

Bibliografia

1. NARDIELLO S., PASQUALE G., GAETA G.B., RAPICETTA M. and GIUSTI G.: Diagnostic flow chart in chronic HCV infection. A proposal. *Giorn. It. Mal. Inf.*, 2: 8-17, 1996.
2. AMOROSO P., RAPICETTA M., TOSTI M.E., MELE A., SPADA E., BUONOCORE S., LETTIERI G., PIERRI P., CHIONNE P., CICCAGLIONE A.R. and SAGLIOCCA L.: Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis C. *Hepatology*, In press, 1998.
3. GUADAGNINO V., STROFFOLINI T., RAPICETTA M., COSTANTINO A., KONDILI L., MENNITI IPPOLITO F., CAROLEO B., COSTA C., GRIFFO G., LOIACONO L., PISANI V., FOCÀ A. and PIAZZA M.: Prevalence, risk factors and genotype distribution in the general population. A community-based survey in southern Italy. *Hepatology*, 26 (4) 1011-1016, 1997.
4. STROFFOLINI T., GUADAGNINO V. and RAPICETTA M.: Alanine aminotransferase test to detect anti-HCV positive subjects in non-selected populations. *J Clin Pathol*, 50: 709, 1997.
5. STROFFOLINI T., GUADAGNINO V., CHIONNE P., PROCOPIO B., MAZZUCA E.G., QUINTIERI F., SCERBO P., GIANCOTTI A., NISTICÒ S., FOCÀ A., TOSTI M.E., RAPICETTA M.: A population based survey of hepatitis B virus infection in a southern Italian town. *It. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 29: 415-418, 1997.
6. SPADA E., CICCAGLIONE A.R., DETTORI S., CHIONNE P., KONDILI L.A., RAPICETTA M.: HCV genotyping in the Core Region: an optimisation of multiple PCR. *Research in Virol*, Inviato per la pubblicazione, 1998.
7. RAPICETTA M., CICCAGLIONE A.R., ARGENTINI C., DETTORI S., CHIONNE P., KONDILI L.A., VALDARCHI C., MICELI M., MANNELLA E.: Genome characterisation of HCV. A study on periodic and occasional blood donors. (Manuscript in preparation), 1998.